

# **Untersuchung der Siderophore in *Ustilago maydis*: Biosynthese, Transport, Funktion und Regulation**



**Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat)**

Dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Britta Winterberg**  
aus Telgte

Marburg/Lahn, 2008



Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als  
Dissertation angenommen am 14.11.2008

Erstgutachterin: Prof. Dr. Regine Kahmann  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker  
Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2008



Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2005 bis November 2008 am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen unter Betreuung von Dr. Jan Schirawski durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht oder wurden eingereicht in:

**Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kämper, J., Müller, P., Kahmann, R.** (2006) A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence of *Ustilago maydis*. *Plant Cell*, **18**: 3332-3345.

**Winterberg, B., Linne, U., Lessing, F., Marahiel, M., Eichhorn, H., Kahmann, R., Schirawski, J.** Elucidation of the complete siderophore biosynthetic pathways in *Ustilago maydis*, eingereicht bei *Mol. Micro.*

**Winterberg, B. Kahmann, R., Schirawski, J.** Siderophores in *Ustilago maydis*: analysis of function, regulation and transport. eingereicht bei *PLoS Biology*.



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Siderophore in *Ustilago maydis*: Biosynthese, Transport, Funktion und Regulation“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich dabei keiner anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

Ort, Datum

---

Britta Winterberg





Wahrlich, es ist nicht das Wissen, sondern das Lernen,  
nicht das Besitzen, sondern das Erwerben,  
nicht das Da-Seyn, sondern das Hinkommen,  
was den größten Genuss gewährt.

*Carl Friedrich Gauß (1777–1855)*



## Zusammenfassung

Eisen ist für nahezu alle Lebewesen essentiell, da es als Co-Faktor vieler Enzyme dient. Seine Aufnahme stellt eine große Herausforderung dar, weil es unter aeroben Bedingungen und neutralem pH in Form von schwer löslichen Eisenoxiden vorliegt. Um diesem Problem entgegen zu wirken, hat der phytopathogene Basidiomycet *U. maydis* zwei hoch-affine Eisenaufnahmesysteme entwickelt: ein Permease- und ein Siderophor-basiertes System.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die Biosynthesewege der beiden Siderophore Ferrichrom und Ferrichrom A aufzuklären. Neben den bereits bekannten Enzymen Sid1, Sid2 und Fer3 sind Fer4, Fer5, Fer8, Hcs1, Act1 und Act2 an der Siderophorsynthese beteiligt. Die eisenabhängig regulierten Gene *fer4*, *fer5* und *fer8* sind essentiell für die Generierung von Ferrichrom A, wie durch Herstellung von Deletionsmutanten und HPLC-Analyse von Kulturüberständen gezeigt werden konnte. Des Weiteren konnte durch konstitutive Expression der Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase Hcs1 gezeigt werden, dass HMG-CoA als Vorläufer der Ferrichrom A-Biosynthese dient. An der Synthese von Ferrichrom sind die beiden Acetyltransferasen Act1 und Act2 beteiligt, die den letzten noch unaufgeklärten Schritt der Ferrichrom-Biosynthese in *U. maydis* katalysieren.

Ferner konnten zwei Gene von *U. maydis* durch Hefekomplementationsversuche identifiziert werden, deren Genprodukte Importaktivität für Ferrichrom (*fer6*, *cim1*) und Ferrichrom A (*fer6*) zeigen. Neben seiner Siderophorimportaktivität, dient Fer6 auch als Siderophorexporter, wie durch Herstellung von *U. maydis*  $\Delta$ *fer6*-Mutanten gezeigt werden konnte.

Funktionsuntersuchungen haben ergeben, dass Siderophore wichtig für das Wachstum von *U. maydis* in axenischer Kultur sind. Sie spielen eine Rolle als Eisenspeicher in den Vakuolen (Ferrichrom und Ferrichrom A) und im Cytoplasma (Ferrichrom), sind aber entbehrlich für die Virulenz von *U. maydis*. Durch Analyse von Sporen der Doppelmutanten  $\Delta$ *sid2* $\Delta$ *fer3*, die keine Siderophore synthetisieren, konnte gezeigt werden, dass die Siderophore essentiell für die Einlagerung von Eisen in Sporen sind, um den Ablauf der Meiose während der Sporenkeimung zu gewährleisten. Im Einklang mit diesen Beobachtungen konnte durch quantitative RT-PCR gezeigt werden, dass die Expression des Siderophorsynthesegens *sid1* während der frühen biotrophen Phase reprimiert wird. Diese Repression könnte in Abhängigkeit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stattfinden, das in Folge der Abwehrreaktion von der Pflanze gebildet wird. Durch Northern Blot-Analysen konnte belegt werden, dass die Expression von *sid1* durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in axenischer Kultur reprimiert wird. Als möglicher Regulator der Siderophorbiosynthese kommt Yap1 in Frage, das während der Infektion durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert wird. Diese Beobachtung legt nahe, dass *U. maydis* ein Abwehrsignal der Pflanzen nutzt, um die Siderophorexpression zu regulieren.



## Abkürzungen und Fachbegriffe

A	Alanin	IPTG	Isopropyl-b-
AS	Aminosäuren		Thiogalactopyranosid
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	K	Lysin
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	kb	Kilobasenpaar (1000 bp)
Amp	Ampicillin	L	Leucin
Ara	Arabinose	l	Liter
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	M	Molar und auch Methionin
BPS	Bathophenanthrolin-Disulfonsäure-Dinatriumsalz	<i>M. grisea</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid	min	Minute
bp	Basenpaar(e)	mM	Millimolar
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
BSA	Rinder Serumalbumin	N	beliebiges Nukleotid oder auch
C	Cystein und auch Kohlenstoff		Asparagin oder Stickstoff
ca.	Circa	Nat	Nourseothricin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	nm	Nanometer
CAS	Chromazurol S	N-terminal	aminoterminal
Cbx	Carboxin	OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
<i>C. heterostrophus</i>	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	Oligonukleotid	Startoligonukleotid
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	ORF	offener Leserahmen
CM	complete medium	P	Prolin
C-terminal	carboxyterminal	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
D	Asparaginsäure	PC	Phenol/Chloroform
d. h.	das heißt	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DIC	„differential interference contrast“	<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
DMA	Desoxymegeinsäure	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DMF	Dimethylformamid	Q	Glutamin
DMSO	Dimethylsulfoxid	qRT-PCR	Quantitative real time PCR
DNA	Desoxyribonukleinsäure	R	Arginin
DNase	Desoxyribonuklease	RNA	Ribonukleinsäure
dATP (A)	Desoxyadenosintriphosphat	RNase	Ribonuklease
dCTP (C)	Desoxycytidintriphosphat	S	Serin
dGTP (G)	Desoxyguanosintriphosphat	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
dTTP (T)	Desoxythymidintriphosphat	sec	Sekunde
E	Glutaminsäure	T	Threonin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	TE	Tris-HCl/EDTA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Tris	Trishydroxymethylamino-methan
<i>E. chrysanthemi</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>U. maydis</i>	<i>Ustilago maydis</i>
F	Phenylalanin	<i>U. sphaerogena</i>	<i>Ustilago sphaerogena</i>
FB	Fluorescent brightener, Calcofluor white	üN	über Nacht
G	Glycin	Upm	Umdrehungen pro Minute
g	Gramm	V	Volt oder Valin
Glc	Glucose	X	beliebige Aminosäure
H	Histidin	Y	Tyrosin
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser	z.B.	zum Beispiel
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxyd	wt	Wildtyp
h	Stunde		
Hyg	Hygromycin		
I	Isoleucin		



# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE.....</b>	<b>II</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hoch-affine Eisenaufnahmesysteme in <i>U. maydis</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Regulation der Eisenaufnahmesysteme in <i>U. maydis</i> durch den         Transkriptionsfaktor Urbs1.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 <i>U. maydis</i> als Modellorganismus zur Untersuchung der hoch-affinen         Eisenaufnahmemechanismen.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Die Bedeutung der Eisenaufnahmesysteme für andere Pathogene.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>	<b>10</b>
<b>2. ERGEBNISSE.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Untersuchung der Siderophorbiosynthese in <i>U. maydis</i> .....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Ferrichrom A-Biosynthese.....	11
2.1.1.1 Gene des Urbs1-regulieren Genclusters auf Chromosom II sind an der Ferrichrom A-Biosynthese beteiligt .....	11
2.1.1.2 Putativer Ferrichrom A-Biosyntheseweg.....	12
2.1.1.3 Versuch des Nachweises von $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA als Zwischenstufe der Ferrichrom A-Biosynthese.....	13
2.1.1.4 Identifikation der HMG-CoA-Synthase Hcs1 von <i>U. maydis</i> .....	16
2.1.1.5 Die Repression der HMG-CoA-Synthase Hcs1 führt zu einem Zellseparierungsdefekt.....	17
2.1.1.6 Optimierung des CAS-Assays zur Quantifizierung von Siderophoren in Kulturüberständen.....	19
2.1.1.7 HMG-CoA ist für die Ferrichrom A-Biosynthese essentiell.....	21
2.1.2 Ferrichrom-Biosynthese.....	23
2.1.2.1 Identifikation putativer Acetyltransferasen.....	24
<b>2.2 Siderophortransport in <i>U. maydis</i>.....</b>	<b>27</b>
2.2.1 Siderophorimport.....	27
2.2.1.1 Identifikation putativer Siderophortransporter in <i>U. maydis</i> .....	27
2.2.1.2 Fer6 und Cim1 sind Siderophorimporter.....	28
2.2.2 Fer6 ist ein Siderophorexporter.....	29
<b>2.3 Die Bedeutung der Siderophore für <i>U. maydis</i>.....</b>	<b>31</b>
2.3.1 Siderophore sind essentiell für das Wachstum in axenischer Kultur.....	31
2.3.2 Ferrichrom dient als Eisenspeicher im Cytoplasma und schützt vor oxidativem Stress, der durch freies Eisen ausgelöst wird.....	32
2.3.3 Ferrichrom und Ferrichrom A dienen als Eisenspeicher in den Vakuolen.....	33
2.3.4 Siderophore spielen keine Rolle für die Virulenz von <i>U. maydis</i> .....	36

2.3.5 Siderophore sind essentiell für die Eisenspeicherung in Sporen von <i>U. maydis</i> .....	37
<b>2.4 Regulation der Siderophorbiosynthese.....</b>	<b>40</b>
2.4.1 Die Expression von <i>sid1</i> , jedoch nicht von <i>fer2</i> , ist während der frühen Infektionsphase reprimiert.....	41
2.4.2 Yap1 ist ein möglicher Repressor der Siderophorbiosynthese.....	42
2.4.3 Die Expression von <i>sid1</i> , nicht aber von <i>fer2</i> , wird durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> reprimiert.....	45
<b>3. DISKUSSION.....</b>	<b>47</b>
3.1 Siderophorbiosynthese.....	47
3.2 Identifikation von Siderophortransportern.....	51
3.3 Die Bedeutung der Siderophore für die Eisenspeicherung.....	54
3.4 Bedeutung und Regulation der hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme während des Lebenszyklus von <i>U.maydis</i> .....	56
<b>4. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>63</b>
4.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Enzyme und Kits.....	63
4.2 Kultivierungsmethoden.....	63
4.3 Oligonukleotide.....	71
4.4 Plasmide und Konstrukte.....	73
4.5 Stämme.....	79
4.6 Molekularbiologische Methoden.....	81
4.7 Mikroskopie.....	87
4.8 Isolation, Quantifizierung und Detektion von Siderophoren.....	88
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>93</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>101</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>103</b>



# 1. Einleitung

Eisen ist für nahezu alle Lebewesen essentiell, da es als Co-Faktor vieler Enzyme dient. Obwohl Eisen eines der häufigsten Elemente in der Erdkruste ist (Ehrlich, 1990), stellt seine Aufnahme eine große Herausforderung dar. Unter aeroben Bedingungen und neutralem pH oxidiert es zu Eisenoxiden, die nur schwer löslich sind (Loeppert *et al.*, 1994). Daher haben viele Organismen spezielle und hoch-affine Eisenaufnahmesysteme entwickelt, um ihren Bedarf an Eisen decken zu können. Aber auch ein Überschuss an Eisen kann für die Zellen schädlich sein, da durch die sogenannte Fenton-Reaktion Hydroxylradikale entstehen können, die DNA, Lipide und Proteine schädigen können (Halliwell und Gutteridge, 1984). Aufnahme und Speicherung von Eisen sind daher streng regulierte Prozesse.

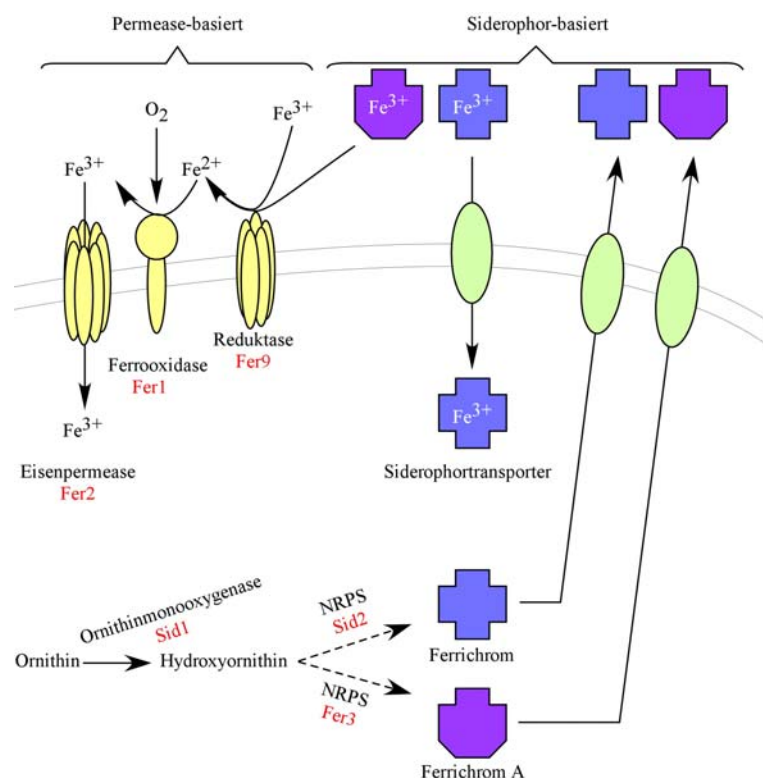
## 1.1 Hoch-affine Eisenaufnahmesysteme in *U. maydis*

Der phytopathogene Basidiomycet *Ustilago maydis* besitzt zwei hoch-affine Eisenaufnahmesysteme: ein Permease- und ein Siderophor-basiertes System (Abbildung 1). Für die Aufnahme von Eisen über die Eisenpermease Fer2 wird zunächst  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert. Diese Reduktion findet wahrscheinlich durch die Eisenreduktase Fer9 statt. Anschließend oxidiert die Ferrooxidase Fer1 das Eisen wieder zu  $\text{Fe}^{3+}$ , bevor es in die Zelle aufgenommen werden kann. In *S. cerevisiae* findet die Permease-basierte Eisenaufnahme durch einen heterodimeren Proteinkomplex aus der Ferrooxidase Fet3p und die Eisenpermease Ftr1p statt (Kwok *et al.*, 2006). Dabei interagieren die beiden Proteine so eng miteinander, dass es zu einer direkten Übertragung des Eisens von Fet3p auf Ftr1p kommt. Es scheint daher auch für *U. maydis* wahrscheinlich, dass die Proteine des Permease-basierten Aufnahmesystems enge Proteinkomplexe bilden.

Das Permease-basierte System ist essentiell für die Virulenz von *U. maydis* (Eichhorn *et al.*, 2006). Deletionsmutanten von *fer1* oder *fer2* zeigen eine drastische Reduktion der Pathogenität.

Neben dem Permease-basierten System haben viele Pilze eine weitere Möglichkeit entwickelt, um Eisen trotz seiner geringen Löslichkeit aufnehmen zu können. Sie

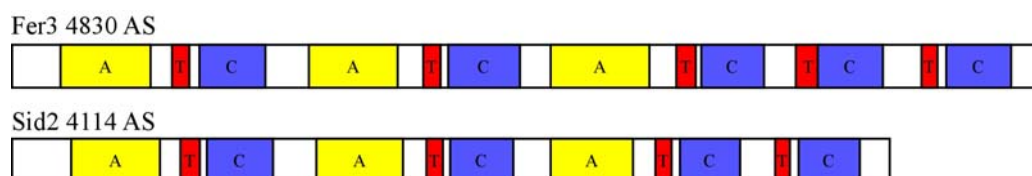
synthetisieren sogenannte Siderophore (Lankford, 1973). *U. maydis* synthetisiert die Siderophore Ferrichrom und Ferrichrom A (Budde und Leong, 1989). Diese gehören wie die pilzlichen Siderophore Coprogen und Fusarinin zu der Gruppe der Hydroxamate (Haas, 2003). Hydroxamate sind zyklische Hexapeptide und bestehen aus drei modifizierten Ornithinen und drei konventionellen Aminosäuren. Siderophore werden von den Zellen sekretiert und binden mit sehr hoher Affinität an Eisen. Dabei wird Eisen durch sechs Sauerstoffatome der Ornithine koordiniert. Siderophore können entweder wieder in die Zelle aufgenommen werden, in der das Eisen durch Reduktion abgelöst wird, oder sie liefern ihr Eisen an das Permease-basierte System (Budde und Leong, 1989).



**Abbildung 1: Hoch-affine Eisenaufnahmesysteme von *U. maydis*.** Das Permease-basierte System besteht aus der Reduktase Fer9, der Ferrooxidase Fer1 und der Eisenpermease Fer2. Diese drei Proteine bilden einen Komplex, der für die direkte Aufnahme von Eisen aus der Umgebung verantwortlich ist. *U. maydis* sekretiert die Siderophore Ferrichrom und Ferrichrom A. Die Synthese beider Siderophore beginnt mit der Hydroxylierung von Ornithin zu Hydroxyornithin durch Sid1. Für die Synthese von Ferrichrom werden drei acetylierte Hydroxyornithine mit drei Glycinresten durch die NRPS Sid2 zyklisiert (Yuan *et al.*, 2001). Für die Synthese von Ferrichrom A ist die NRPS Fer3 verantwortlich, die drei Hydroxyornithine mit einem Glycin- und zwei Serinresten verknüpft (F. Lessing, pers. Mitteilung).

Die Synthese von Ferrichrom und Ferrichrom A ist intensiv an *U. sphaerogena* untersucht worden. So konnte 1966 gezeigt werden, dass die Hydroxylierung von Ornithin den initialen Schritt der Siderophorbiosynthese in *U. sphaerogena* darstellt (Emery, 1966). In *U. maydis* wird die Hydroxylierung von Ornithin zu Hydroxyornithin durch die Ornithinmonooxygenase Sid1 katalysiert (Wang *et al.*, 1989, Mei *et al.*, 1993). Für die Synthese von Ferrichrom muss Hydroxyornithin acetyliert werden, bevor die Nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS) Sid2 drei Acetylhydroxyornithine mit drei Glycinresten zyklisiert (Yuan *et al.*, 2001). Für die Synthese von Ferrichrom A ist die NRPS Fer3 verantwortlich (F. Lessing, pers. Mitteilung). Die Ferrichrom A-Synthese erfolgt vermutlich durch die Zyklisierung von drei modifizierten Hydroxyornithinen mit einem Glycin- und zwei Serinresten.

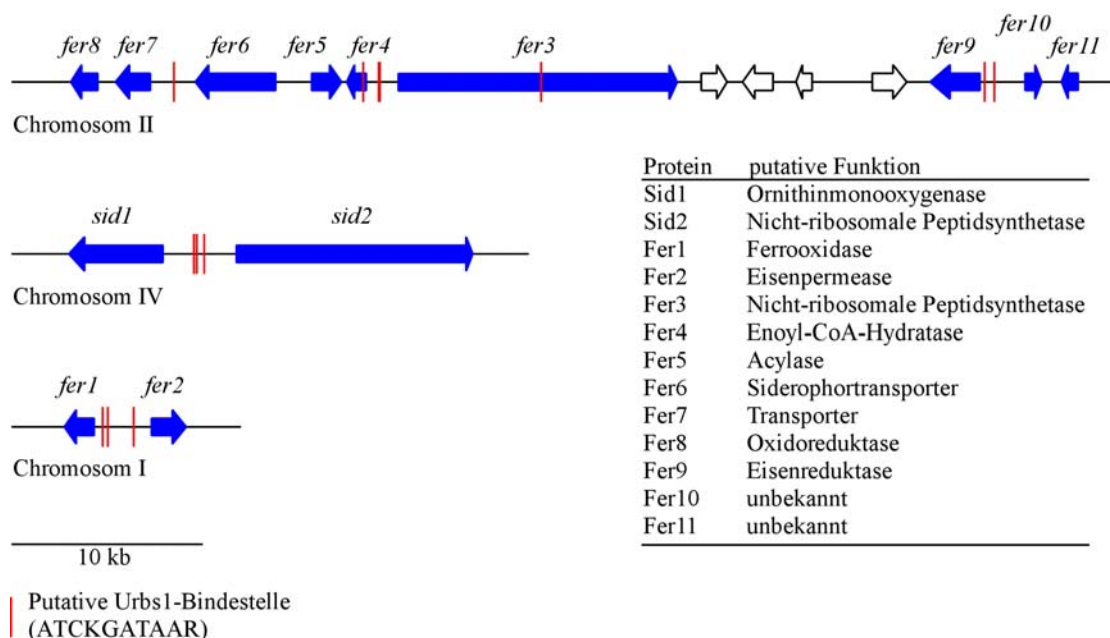
NRPS sind multimodulare Enzyme mit einer komplexen Domänenstruktur (Abbildung 2), die die Bildung von Peptidbindungen zwischen Aminosäuren katalysieren. Jedes Modul dieser großen Enzyme besteht aus einer Acylträgerdomäne (A-Domäne), die die einzubauende Aminosäure aktiviert und auf eine 4-Phosphopantetheinbinde-Domäne überträgt (T-Domäne). Dadurch wird ein Thioester gebildet. Zwei Aminosäuren, die an benachbarte T-Domänen gebunden sind, können durch eine Peptidbindung miteinander verknüpft werden. Dieser Schritt wird durch eine Kondensationsdomäne (C-Domäne) katalysiert (Finking und Marahiel, 2004). Fer3 besitzt drei vollständige Module mit jeweils einer A-, einer T- und einer C-Domäne (Abbildung 2). Außerdem finden sich jeweils zwei weitere T- und C-Domänen. In Sid2 kommen neben den drei vollständigen Modulen jeweils eine zusätzliche T- und C-Domäne vor (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Domänenstruktur von Fer3 und Sid2.** Lokalisation der InterPro Domänen in den zwei NRPS Sid2 und Fer3 von *U. maydis*. A: Acylträgerdomäne, IPR009081; T: Phosphopantetheinbinde-Domäne, IPR006163; C: Kondensationsdomäne, IPR001242 (InterProScan v7.1; Zdobnov und Apweiler, 2001).

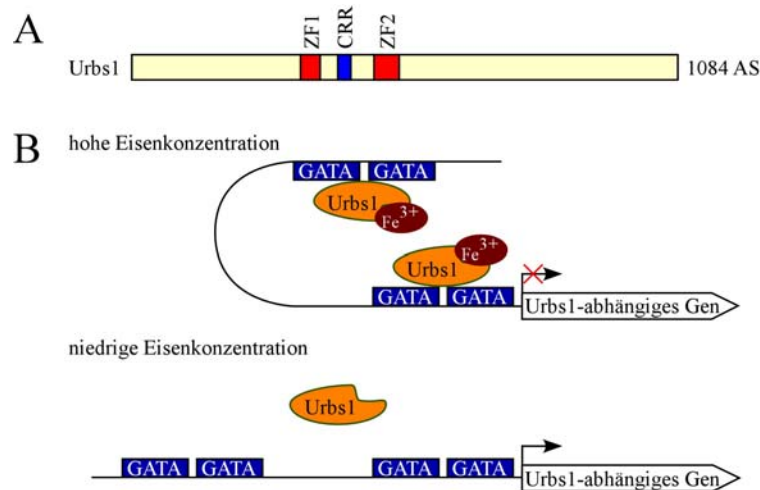
## 1.2 Regulation der Eisenaufnahmesysteme in *U. maydis* durch den Transkriptionsfaktor Urbs1

Neben der Analyse der beteiligten Enzyme ist die Regulation der Siderophorbiosynthese in *U. maydis* untersucht worden. Die extrazelluläre Konzentration beider Siderophore kann nach einwöchiger Inkubation in Eisenmangelmedium bis zu 0,5 mM erreichen. Im Gegensatz dazu können Siderophore nicht detektiert werden, wenn das Wachstumsmedium mit Eisen supplementiert wird. Dabei findet eine Repression der Siderophorbiosynthese bereits sechs Stunden nach der Zugabe von Eisen statt (Budde und Leong, 1989). Urbs1 konnte als Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der an dieser schnellen Reaktion auf den wechselnden Eisengehalt des Mediums beteiligt ist (Voisard *et al.*, 1993). Auch die Komponenten des Permease-basierten Eisenaufnahmesystems werden durch Urbs1 reguliert (Eichhorn *et al.*, 2006). Die Gene, die für die hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme codieren, sind in *U. maydis* in drei Gruppen auf den Chromosomen eins, zwei und vier lokalisiert (Abbildung 3). Neben ihrer räumlichen Nähe zueinander werden sie zudem gemeinsam eisenabhängig durch den Transkriptionsfaktor Urbs1 reguliert (Voisard *et al.*, 1993, Budde und Leong, 1989, Yuan *et al.*, 2001, Eichhorn *et al.*, 2006).



**Abbildung 3: Die Gene der hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme liegen in Clustern vor.** Blau unterlegte Gene codieren für Komponenten der hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme und werden eisenabhängig durch Urbs1 reguliert. Putative Urbs1-Bindestellen der Konsensussequenz GATA sind durch rote Striche gekennzeichnet.

Urbs1 gehört zur Gruppe der sogenannten GATA-Transkriptionsfaktoren. Urbs1 ist 1084 Aminosäuren lang und enthält zwei Zinkfingerdomänen und eine cysteinreiche Domäne (Abbildung 4 A).



**Abbildung 4: Der eisenabhängige Transkriptionsfaktor Urbs1.** A. Urbs1 enthält zwei Zinkfingerdomänen (ZF), von denen nur die zweite an der DNA-Bindung beteiligt ist. Die Bindung an Eisen wird durch die cysteinreiche Region (CRR) vermittelt. B. Bei hoher Eisenkonzentration in der Zelle bindet Urbs1 Eisen, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Proteins kommt. Urbs1 kann nun an die Konsensussequenz GATA in den Promotorbereichen Urbs1-abhängig regulierter Gene binden, was zu einer Krümmung der DNA und Repression der Transkription der Zielgene führt. Bei Eisenmangel verliert Urbs1 seine Affinität zu DNA und die Transkription findet statt. (Abbildung modifiziert nach An *et al.*, 1997b).

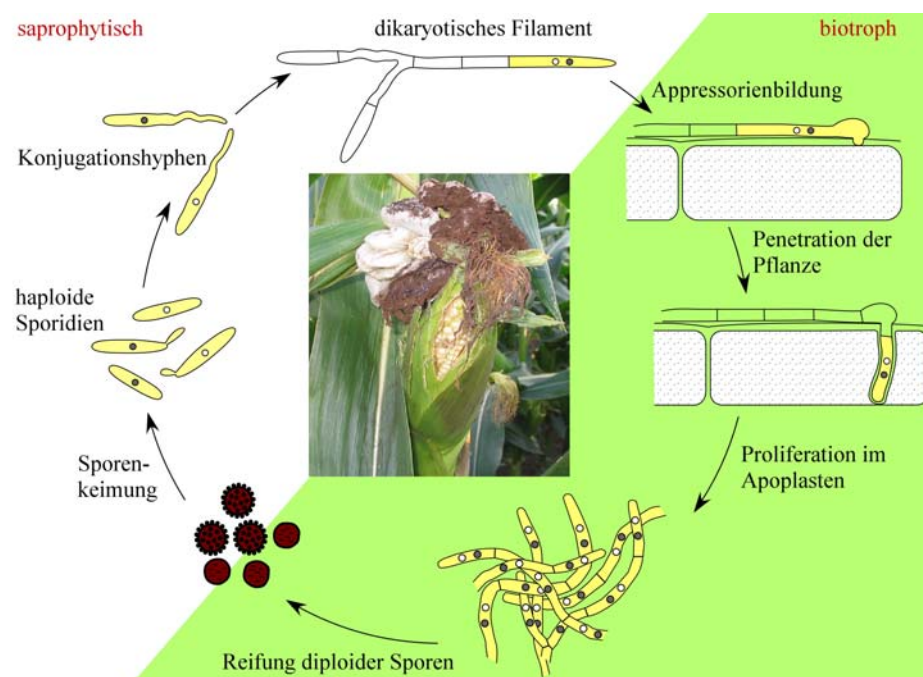
Liegt eine hohe Eisenkonzentration innerhalb der Zelle vor, bindet die cysteinreiche Region von Urbs1 an Eisen. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins und Urbs1 kann an die Erkennungssequenz GATA in den Promotoren von Zielgenen binden. Dass die DNA-Bindung nur über den zweiten Zinkfinger vermittelt wird, konnte für den Promotor von *sid1* gezeigt werden (An *et al.*, 1997a). Durch die Bindung von Urbs1 an den Promotorbereich kommt es zu einer Krümmung der DNA (An *et al.*, 1997a, Abbildung 4 B). Diese Krümmung und die Bindung des Promotorbereiches durch Urbs1 resultiert in einer Repression der Transkription. Bei Eisenmangel hingegen verliert Urbs1 seine Affinität zur DNA und die Transkription der Urbs1-abhängig regulierten Gene kann stattfinden (An *et al.*, 1997b).

### 1.3 *U. maydis* als Modellorganismus zur Untersuchung der hoch-affinen Eisenaufnahmemechanismen

Ferrichrom wurde erstmals aus *Ustilago sphaerogena* isoliert (Neilands, 1952) und wenige Jahre später auch in *U. maydis* nachgewiesen (Keller-Schierlein *et al.*, 1964). Für *U. sphaerogena* konnte bereits 1955 die Synthese von Ferrichrom A nachgewiesen werden (Garibaldi und Neilands, 1955). Damit stellten *U. sphaerogena* und *U. maydis* die ersten Organismen dar, in denen Siderophore nachgewiesen und charakterisiert wurden. 1960 konnten die chemischen Strukturen von Ferrichrom und Ferrichrom A aufgeklärt werden (Emery und Neilands, 1961). Dabei beruhte die Analyse der Struktur auf der Grundlage der Molekulargewichte der beiden Substanzen. Die Bestimmung der Kristallstrukturen bestätigten den postulierten Aufbau der beiden Siderophore (van der Helm *et al.*, 1980).

*U. maydis* war für die Untersuchung der Eisenaufnahmesysteme besonders interessant, da er während der saprophytische Phase seines Lebenszyklus leicht unter Laborbedingungen kultiviert werden kann. In dieser Phase vermehrt er sich hefeartig durch Knospung (Abbildung 5). In der biotrophe Phase ist *U. maydis* auf die Vermehrung in seiner Wirtspflanze Mais angewiesen. Die pathogene Entwicklung beginnt mit der Erkennung zweier kompatibler Sporidien (Abbildung 5), die sich in ihrem *a*-Paarungstyplocus unterscheiden. Dieser Locus mit den Allelen *a1* und *a2* codiert für ein Pheromon/Pheromonrezeptor-System das entscheidend für die Zell-Zell-Erkennung ist (Bölker *et al.*, 1992). Die Gene *mfa1* bzw. *mfa2* codieren für Pheromone, die von der jeweils anderen Zelle über die Rezeptoren Pra2 bzw. Pra1 wahrgenommen werden können. Nur wenn sich zwei Zellen in diesen Komponenten des *a*-Locus unterscheiden, kommt es zur Erkennung der Zellen und zur Bildung von Konjugationshyphen (Rowell und DeVay, 1954, Holliday, 1961, Bölker *et al.*, 1992, Spellig *et al.*, 1994a und b). Unterscheiden sich die fusionierten Sporidien auch in ihrem *b*-Paarungstyplocus voneinander, so wird das filamentöse Wachstum aufrecht erhalten und es kommt nachfolgend zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Anschließend wächst das Filament an der Spitze weiter und hinterlässt cytoplasmafreie Bereiche, die durch Septen von der Spitzenzelle getrennt sind. Dieses Filament stellt das infektiöse Stadium von *U. maydis* dar. Auf der Pflanzenoberfläche kommt es zu Ausbildung von Appressorien, mittels derer die Pflanzenoberfläche penetriert werden kann (Snetselaar und Mims, 1992). In der folgenden biotrophen Phase

proliferiert *U. maydis* zunächst intrazellulär und später im Apoplasten seiner Wirtspflanze Mais. Ca. sechs Tage nach der Infektion werden die Tumore als typische Krankheitssymptome sichtbar. *U. maydis* ist in der Lage, Tumorbildung an allen überirdischen Bereichen der Pflanze zu induzieren (Christenson und Robinson, 1963, Banuett, 1995). In den Tumoren kommt es zur Karyogamie und Reifung der diploiden Teliosporen, die nach dem Aufplatzen der Tumore durch Wind und Regen verbreitet werden. Die schwarze Färbung der Sporen verleiht den infizierten Pflanzenbereichen ein verbranntes Aussehen. Aus diesem Grund wird die durch *U. maydis* verursachte Krankheit als Maisbeulenbrand bezeichnet. Unter geeigneten Bedingungen können die freigesetzten Sporen als Promycel auskeimen, in dem die Meiose stattfindet. Aus dem Promycel entstehen dadurch wieder haploide Sporidien und der Lebenszyklus kann von neuem beginnen.



**Abbildung 5: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.** Nach der Erkennung zweier kompatibler Sporidien bilden diese Konjugationshyphen aus und wachsen aufeinander zu. Sie fusionieren zu einem dikaryotischen Filament, das an der Spitze weiter wächst und cytoplasmafreie Bereiche zurücklässt, die durch Septen von der Spitzenzelle getrennt sind. Nach der Penetration der Pflanzenoberfläche durch ein Apressorium kommt es zur massiven Proliferation im Apoplasten der Wirtspflanze. In dieser Phase kommt es zur Induktion von Tumoren, die sich an allen überirdischen Bereichen der Maispflanze bilden können. In diesen Tumoren reifen die diploiden Sporen heran, die nach ihrer Freisetzung die Meiose durchlaufen und haploide Sporidien generieren. (Abbildung modifiziert nach J. Schirawski).

*U. maydis* wurde in den vergangenen zwei Jahrzehnten als Modellorganismus etabliert. Unter anderem eignet sich *U. maydis* neben der Untersuchung der

Siderophore auch zur Analyse anderer Sekundärstoffwechselprodukte (Teichmann *et al.*, 2007, Zuther *et al.*, 2008, Bölker *et al.*, 2008). Für diesen Zweck ist es nützlich, dass seit einigen Jahren die Genomsequenz von *U. maydis* vorliegt ([http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago\\_maydis/](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/), Kämper *et al.*, 2006). Durch die genetische und molekularbiologische Zugänglichkeit von *U. maydis* können gezielt Gendelektionen und Promotor- sowie Proteinfusionen hergestellt werden. Von besonderem Vorteil ist auch die leichte Kultivierbarkeit der Wirtspflanze Mais und das Auftreten von sichtbaren Infektionssymptomen innerhalb weniger Tage. Dadurch kann die Bedeutung einzelner Gene für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* in weniger als zwei Wochen analysiert werden.

#### 1.4 Die Bedeutung der Eisenaufnahmesysteme für andere Pathogene

Für *U. maydis* scheinen die beiden hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme unterschiedliche Bedeutungen während der pathogenen Entwicklung zu haben. Während das Permease-basierte System essentiell für die Virulenz von *U. maydis* ist (Eichhorn *et al.*, 2006), zeigen Mutanten, die keine Siderophore synthetisieren, keine Reduktion der Pathogenität (Mei *et al.*, 1993, Abschnitt 2.3.4). Genau umgekehrt stellt sich die Situation in dem humanpathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus* dar. Die Deletion der Eisenpermease Ftr1 hat keinen Einfluss auf die Virulenz, während die Siderophore von zentraler Bedeutung für die Pathogenität sind (Schrettl *et al.*, 2004a). Für *A. fumigatus* wurde gezeigt, dass das intrazelluläre Siderophor Hydroxyferricrocin während der Sporenkeimung und der Bildung des Keimschlauchs, sowie für die Resistenz gegen oxidativen Stress eine besondere Rolle spielt (Schrettl *et al.*, 2007). Für die pathogene Entwicklung von *Candida albicans* ist die Eisenaufnahme mittels beider hoch-affiner Systeme notwendig. Sowohl die Deletion der Eisenpermease CaFtr1 als auch des Siderophorimporters Sit1p/Arn1p führt zur Reduktion der Pathogenität von *C. albicans* (Heymann *et al.*, 2002, Ramanan und Wang, 2000). Deletionsmutanten von *sit1/arn1* sind apathogen in Epithelzellkulturen, die ein Modell der menschlichen Oralmucosa darstellen, können aber noch zu systemischen Infektionen bei Mäusen führen (Heymann *et al.*, 2002). Deletionsmutanten von *ftr1* hingegen sind nicht mehr in der Lage, systemische Infektionen bei Mäusen zu verursachen (Ramanan und Wang, 2000).



In Interaktionen von Pilzen mit pflanzlichen Wirten spielt die Synthese von Siderophoren ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Virulenz. Der Ascomycet *Cochliobolus heterostrophus* synthetisiert das Siderophor Coprogen und verschiedene Coprogen-Derivate. Deletionsmutanten der NRPS Nps6 und der Ornithinmonooxygenase SidA1 zeigen eine verringerte Virulenz auf Mais (Oide *et al.*, 2006, Turgeon *et al.*, 2008). *Alternaria brassiciola*-Mutanten der NRPS Nps6, die nicht mehr in der Lage sind, Triacetylfusarinin C zu synthetisieren, sind ebenfalls in ihrer Virulenz beeinträchtigt (Oide *et al.*, 2006). In *Magnaporthe grisea* spielt das intrazellulär Siderophor Ferricrocin eine besondere Rolle während der Infektion von Reis (Hof *et al.*, 2007).

Ein Grund für die verringerte Virulenz von Siderophorsynthesemutanten bei Phytopathogenen könnte neben ihrer verringerten Aufnahme von Eisen auch in der phytotoxischen Wirkung der Siderophore liegen. Für *Colletotrichum gloesporioides* konnte gezeigt werden, dass Ferricrocin als Phytotoxin auf Brombeeren wirkt und dadurch die Infektion erleichtert (Ohra *et al.*, 1995).

Die Sekretion von Siderophoren hat aber nicht nur positive Effekte auf das Wachstum pathogener Mikroorganismen. Für die Interaktion von *Erwinia chrysanthemi*, dem bakteriellen Erreger der Weichfäule, mit *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass Siderophore als Elicitoren der Pflanzenabwehr wirken können. *E. chrysanthemi* synthetisiert die beiden Siderophore Chrysobactin und Achromobactin, die für eine erfolgreiche systemische Infektion essentiell sind (Enard *et al.*, 1988, Franza *et al.*, 2005). Die Sekretion des eisenfreien Chrysobactins zu Eisenaufnahme aus der Pflanze sorgt für einen Anstieg der Ferritinsynthese durch die Pflanze (Dellagi *et al.*, 2005). *A. thaliana* nutzt wie viele Pflanzen Ferritin zur Eisenspeicherung. Durch die Induktion der Ferritinsynthese kann die Pflanze mehr Eisen speichern, das somit nicht mehr dem Pathogen zur Verfügung steht. Dies führt zu einer verminderten Verbreitung innerhalb des Wirtes. Ein Anstieg der Ferritinsynthese wurde auch für *Phytophthora infestans*-infizierte Kartoffelpflanzen gefunden (Mata *et al.*, 2001). Im Einklang mit diesen Beobachtungen führt eine Überexpression von Ferritinsynthesegenen in transgenen Tabakpflanzen zu einer Reduktion der durch Viren oder Pilze hervorgerufen nekrotischen Verletzungen (Deak *et al.*, 1999).

Untersuchungen an Tomaten zeigen, dass durch Pathogene gebildete Siderophore eine systemische Resistenz der Wirtspflanze induzieren können. Eine vorangegangene Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa* führte zu einer erhöhten Resistenz

gegenüber *Botrytis cinerea* (Leeman *et al.*, 1996, Audenaert *et al.*, 2002). Diese Resistenzinduktion konnte nicht beobachtet werden, wenn Infektionsexperimente mit *P. aeruginosa*-Mutanten durchgeführt wurden, die das Siderophor Pychelin nicht synthetisieren können.

Nicht nur in pflanzlichen Wirten stellt die vermehrte Eisenspeicherung in Folge einer Infektion einen Schutzmechanismus dar. Auch im Immunsystem von Tieren und des Menschen stellt die Induktion der Eisenspeicherung in Ferritin eine erste Barriere zur Abwehr von Pathogenen dar (Weinberg, 2000, Schaible und Kaufmann, 2004).

Diese Erkenntnisse machen deutlich, wie eng die Eisenaufnahme von Pathogenen mit der Eisenaufnahme und -speicherung des Wirtes verbunden ist.

### **1.5 Zielsetzung dieser Arbeit**

Ein Hauptziel dieser Doktorarbeit war es, die Biosynthese von Ferrichrom und Ferrichrom A in *U. maydis* zu untersuchen. Obwohl die Struktur beider Siderophore schon lange bekannt war (Emery und Neilands, 1961), konnten bisher nur drei Enzyme identifiziert werden, die an der Siderophorbiosynthese in *U. maydis* beteiligt sind. Um die Siderophorbiosynthesewege von *U. maydis* aufzuklären, sollten Kandidatengene identifiziert und der Einfluss der codierten Enzyme auf die Synthese von Ferrichrom und Ferrichrom A untersucht werden.

Ferner sollte die Bedeutung der Siderophore während des Lebenszyklus von *U. maydis* analysiert werden. Von besonderem Interesse war dabei die Untersuchung, welchen Einfluss der Eisenhaushalt der Pflanze auf die Virulenz von *U. maydis* hat.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Untersuchung der Siderophorbiosynthese von *U. maydis*

*U. maydis* synthetisiert die beiden Siderophore Ferrichrom und Ferrichrom A. Bisher sind erst drei Enzyme, Sid1, Sid2 und Fer3, beschrieben worden, die an der Synthese der Siderophore beteiligt sind. Um weitere Siderophorbiosyntheseenzyme von *U. maydis* zu identifizieren, wurde einerseits nach Genen gesucht, die eisenabhängig über Urbs1 reguliert werden, andererseits wurde mittels Genomanalysen ein Ansatz zur Identifizierung von Kandidatengenen verfolgt, die an der Synthese von Ferrichrom und Ferrichrom A beteiligt sein könnten.

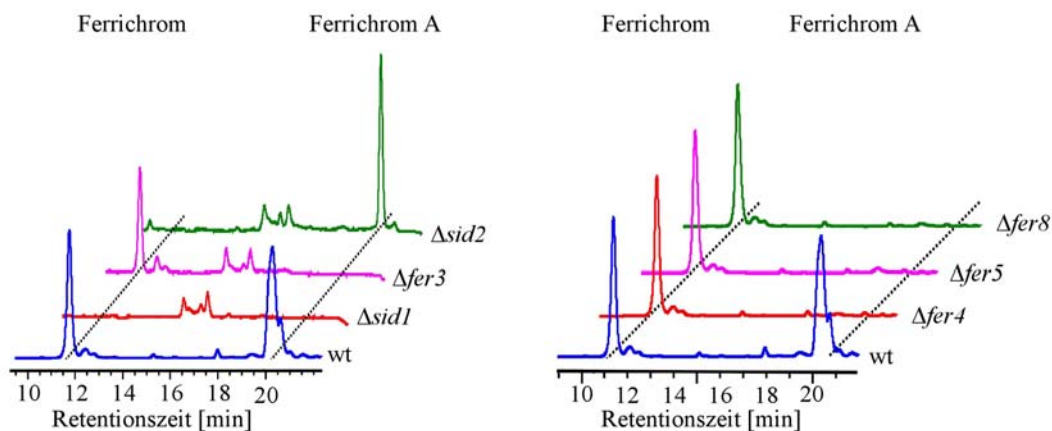
#### 2.1.1 Ferrichrom A-Biosynthese

##### 2.1.1.1 Gene des Urbs1-regulierten Genclusters auf Chromosom II sind an der Ferrichrom A-Biosynthese beteiligt

Der Urbs1- und eisenregulierte Gencluster auf Chromosom II enthält Gene, die für putative Enzyme der Ferrichrom A-Biosynthese codieren (Abbildung 3). Fer3, ebenfalls Mitglied dieses Clusters, ist bereits als NRPS für Ferrichrom A beschrieben worden (F. Lessing, pers. Mitteilung). Um den Einfluss der anderen Gene des Clusters auf die Synthese von Ferrichrom A zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten von *fer4*, *fer5* und *fer8* hergestellt. Alle Deletionen wurden im FB2-Hintergrund durchgeführt. Als Kontrolle wurde außerdem das Gen *sid1* deletiert, das an der Synthese beider Siderophore beteiligt ist. Als weitere Kontrollen wurden die Stämme FB2 $\Delta$ *sid2* und FB2 $\Delta$ *fer3* verwendet, von denen bekannt ist, dass sie nur jeweils eines der beiden Siderophore synthetisieren (Yuan *et al.*, 2001, F. Lessing, pers. Mitteilung).

Um die Siderophorsynthese in diesen Mutanten zu untersuchen, wurden die Stämme FB2 $\Delta$ *sid1*, FB2 $\Delta$ *sid2*, FB2 $\Delta$ *fer3*, FB2 $\Delta$ *fer4*, FB2 $\Delta$ *fer5*, FB2 $\Delta$ *fer8* und der Wildtyp FB2 in CM-Glucose-Medium, das mit 10  $\mu$ M Eisensulfat supplementiert wurde, bis zu einer optischen Dichte von 0,5 angezogen und anschließend für 24 Stunden in eisenfreies CM-Medium überführt. Die synthetisierten Siderophore wurden über

XAD16-Säulen aus den Kulturüberständen isoliert und mittels HPLC analysiert. Im Kulturüberstand des Wildtyps FB2 konnten beide Siderophore nachgewiesen werden (Abbildung 6, links). Aus Kulturüberständen der Mutante FB2 $\Delta$ *sid1* konnten keine Siderophore isoliert werden, während die FB2 $\Delta$ *fer3*-Deletionsmutante kein Ferrichrom A produzierte. Auch in den Kulturen der Deletionsmutanten FB2 $\Delta$ *fer4*, FB2 $\Delta$ *fer5* und FB2 $\Delta$ *fer8* konnte kein Ferrichrom A, aber Ferrichrom detektiert werden (Abbildung 6, rechts). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Gene *fer4*, *fer5* und *fer8* für Enzyme codieren, die neben Sid1 und Fer3 für die Synthese von Ferrichrom A essentiell sind.



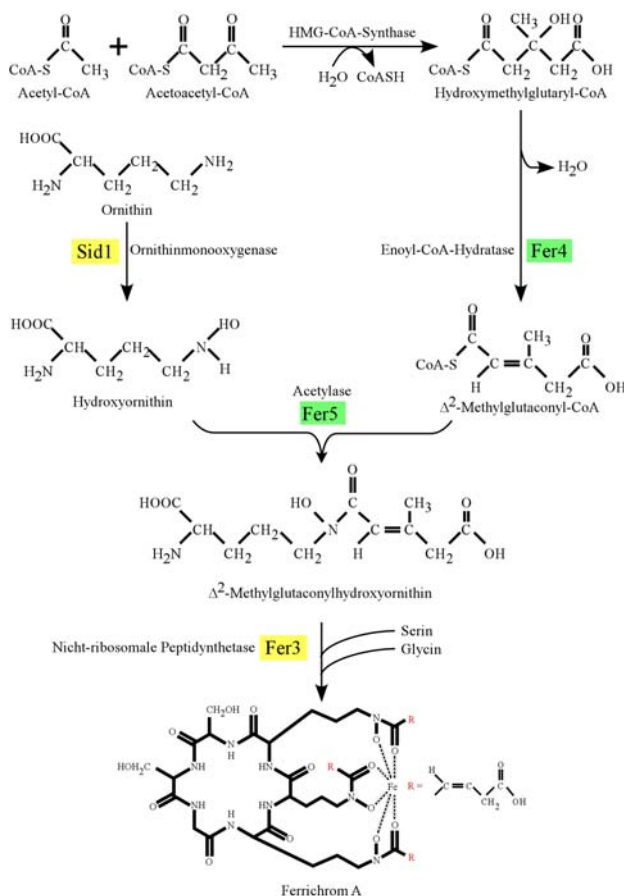
**Abbildung 6: Sid1, Fer3, Fer4, Fer5 und Fer8 sind an der Ferrichrom A-Biosynthese beteiligt.**

Siderophore wurden aus Kulturüberständen des Wildtyps FB2 und der Deletionsmutanten FB2 $\Delta$ *sid1*, FB2 $\Delta$ *sid2*, FB2 $\Delta$ *fer3*, FB2 $\Delta$ *fer4*, FB2 $\Delta$ *fer5* und FB2 $\Delta$ *fer8* isoliert und mittels HPLC analysiert. In den Kulturüberständen der Mutanten FB2 $\Delta$ *sid1*, FB2 $\Delta$ *fer3*, FB2 $\Delta$ *fer4*, FB2 $\Delta$ *fer5* und FB2 $\Delta$ *fer8* ist kein Ferrichrom A detektierbar. FB2 $\Delta$ *sid1* und FB2 $\Delta$ *sid2*-Deletionsmutanten synthetisieren kein Ferrichrom.

#### 2.1.1.2 Putativer Ferrichrom A-Biosyntheseweg

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Fer4, Fer5 und Fer8 an der Biosynthese von Ferrichrom A beteiligt sind, sollten die von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen weiter untersucht werden. Basierend auf den Annotationen für Fer4 als Enoyl-CoA-Hydratase und Fer5 als Acylase (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>) und der Struktur von Ferrichrom A wurde ein putativer Biosyntheseweg für Ferrichrom A postuliert (Abbildung 7). Demnach könnte Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) eine Vorstufe in der Ferrichrom A-Biosynthese darstellen. HMG-CoA liegt in der

Zelle in hoher Konzentration vor, weil es als Grundbaustein für Ergosterol dient, einem wichtigen Bestandteil der pilzlichen Zellwand. Bei der Synthese von Ferrichrom A könnte die Enoyl-CoA-Hydratase Fer4 unter Abspaltung von Wasser eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 2 und 3 von HMG-CoA einführen, wodurch  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA entstehen würde.  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA könnte nun von der Acylase Fer5 an hydroxylierte Aminogruppe von Hydroxyornithin gekoppelt werden. Drei der entstehenden  $\Delta^2$ -Methylglutaconylhydroxyornithin-Moleküle könnten nachfolgend durch die NRPS Fer3 mit einem Glycin und zwei Serinresten zu Ferrichrom A zyklisiert werden.



**Abbildung 7: Putativer Syntheseweg von Ferrichrom A in *U. maydis*.** Auf Basis der Annotationen der Enzyme Fer4 und Fer5 wird postuliert, dass HMG-CoA als erste Vorstufe der Biosynthese von Ferrichrom A dient. HMG-CoA wird von der Enoyl-CoA-Hydratase Fer4 zu  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA umgewandelt und von der Acylase Fer5 an Hydroxyornithin gebunden. Anschließend wird diese mit einem Glycin- und zwei Serinresten durch die NRPS Fer3 zu Ferrichrom A zyklisiert. Gelb unterlegt sind die bereits bekannten Enzyme Sid1 und Fer3, während Fer4 und Fer5 neu identifiziert wurden (grün unterlegt).

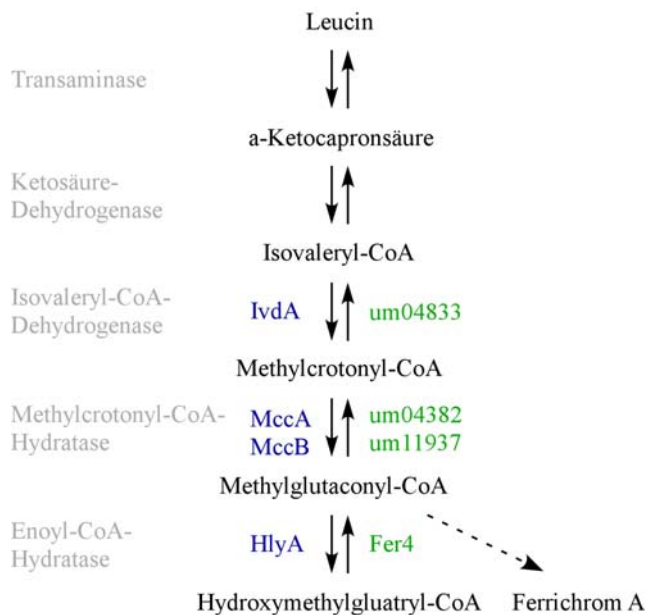
### 2.1.1.3 Versuch des Nachweises von $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA als Zwischenstufe der Ferrichrom A-Biosynthese

Um nachzuweisen, dass HMG-CoA tatsächlich als Vorstufe von Ferrichrom A dient, und Fer4 und Fer5 die postulierten chemischen Reaktionen katalysieren, wurde zunächst versucht,  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA in Kulturüberständen der

Deletionsmutante FB2 $\Delta$ fer5 nachzuweisen. Dazu wurde die Mutante in Eisenmangelmedium angezogen und der Kulturüberstand wie zur Aufreinigung der Siderophore mittels XAD16-Säulen behandelt. Das Eluat wurde mittels HPLC und MS/MS massenspektrometrisch analysiert. Leider konnte  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA in diesem Kulturüberstand nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA energiereich ist und entweder abgebaut wird, sobald es sich in der Zelle anreichert, oder dass es nicht aus der Zelle sekretiert wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA nicht an die XAD16-Säule bindet und daher nicht auf diesem Weg angereichert werden kann. Außerdem ist es denkbar, dass  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA nicht akkumuliert, wenn die Ferrichrom A-Biosynthese durch Deletion eines beteiligten Enzyms nicht vollständig ablaufen kann.

Um die Konzentration von  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA in den Zellen zu erhöhen und dadurch seine Akkumulation wahrscheinlicher zu machen, wurde der Deletionsstamm FB2 $\Delta$ fer5 in Eisenmangelmedium angezogen, das als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle Leucin enthielt. Für *A. nidulans* wurde gezeigt, dass Leucin über  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA zu HMG-CoA abgebaut werden kann (Rodríguez *et al.*, 2004, Abbildung 8).

Im Genom von *U. maydis* finden sich homologe Enzyme zu den für *A. nidulans* beschriebenen Reaktionen (Abbildung 8), die für den Abbau von Leucin notwendig sind. Das Vorhandensein dieses biochemischen Abbauweges in *U. maydis* scheint damit sehr wahrscheinlich. Durch die Zugabe von Leucin zum Wachstumsmedium sollte sich die Konzentration an  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA in der FB2 $\Delta$ fer5-Mutante erhöhen. Um in diesem Versuch die Aufreinigung von  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA nicht von seiner Sekretion aus den Zellen abhängig zu machen, wurden die Zellen der FB2 $\Delta$ fer5-Mutante nach dem Wachstum in Leucin-haltigem Eisenmangelmedium protoplastiert und zum Platzen gebracht. Die aufgeschlossenen Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert. Es war jedoch auch in diesem Versuch leider nicht möglich,  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA zu detektieren (Daten nicht gezeigt).



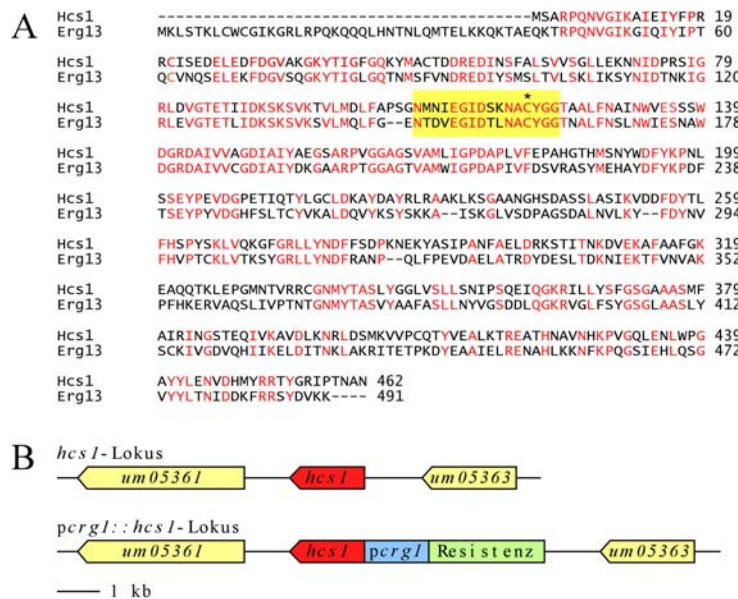
**Abbildung 8: Abbauweg von Leucin in *A. nidulans* und *U. maydis*.** Leucin wird enzymatisch über α-Ketocapronsäure, Isovaleryl-CoA und Methylcrotonyl-CoA zu Methylglutaconyl-CoA umgewandelt und kann durch eine Enoyl-CoA-Hydratase reversibel zu HMG-CoA umgesetzt werden. Enzyme von *A. nidulans* sind blau, homologe Enzyme von *U. maydis* sind grün gekennzeichnet.

Da auf diese Weise das Vorhandensein von  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA nicht nachgewiesen werden konnte und somit noch kein Beweis für die Richtigkeit des postulierten Ferrichrom A-Biosyntheseweges erbracht werden konnte, sollte in einem weiteren Ansatz gezeigt werden, dass die Enzyme Fer4 und Fer5 in der angegebenen Reihenfolge während der Synthese von Ferrichrom A agieren. Zu diesem Zweck wurde der Stamm FB2 $\Delta$ fer5 in Eisenmangelmedium angezogen, die Zellen präzipitiert und die Kulturüberstände sterilfiltriert. Akkumuliert und sekretiert die Mutante FB2 $\Delta$ fer5  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA, sollte es unter Verwendung des Kulturüberstandes der FB2 $\Delta$ fer5-Mutante als Medium für die FB2 $\Delta$ fer4-Mutante, die selbst kein  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA synthetisieren kann, zu einer Komplementation der Ferrichrom A-Biosynthese im Stamm FB2 $\Delta$ fer4 kommen. Der Überstand einer Kultur von FB2 $\Delta$ fer4, angezogen im Kulturüberstand von FB2 $\Delta$ fer5, wurde über XAD-16-Säulen aufgereinigt und auf die Synthesen von Ferrichrom A mittels HPLC analysiert. In den untersuchten Kulturüberständen konnte kein Ferrichrom A detektiert werden. Dies könnte z. B. daran liegen, dass  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA nicht von der Mutante FB2 $\Delta$ fer5 sekretiert wurde oder sekretiertes Methylglutaconyl-CoA nicht von FB2 $\Delta$ fer4 aufgenommen wurde.

2.1.1.4 Identifikation der HMG-CoA-Synthase Hcs1 von *U. maydis*

Da es nicht möglich war, das postulierte Intermediat der Ferrichrom A-Biosynthese mittels HPLC in Kulturüberständen der Deletionsmutante FB2 $\Delta$ *fer5* zu detektieren, sollte ein indirekter Beweis für die Richtigkeit des postulierten Biosyntheseweges geführt werden. Dazu sollte gezeigt werden, dass HMG-CoA essentiell für die Synthese von Ferrichrom A ist. Zu diesem Zweck wurde zunächst die HMG-CoA-Synthase von *U. maydis* identifiziert.

In *S. cerevisiae* wird HMG-CoA aus Acetoacetyl-CoA und Acetyl-CoA durch die HMG-CoA-Synthase Erg13 hergestellt (Servouse und Karst, 1986). Im Genom von *U. maydis* findet sich nur ein offener Leserahmen, der eine signifikante Homologie zu Erg13 aufweist. Das Protein um05362 zeigt 44 % Aminosäureidentität zu Erg13 aus *S. cerevisiae* (Abbildung 9A). Auf Grund der putativen Funktion von um05362 wurde der Name *hcs1* für HMG-CoA-Synthase 1 gewählt, der im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendet wird.



**Abbildung 9: Identifikation der HMG-CoA-Synthase Hcs1 von *U. maydis* und Herstellung der Promotorfusion *pcrg1::hcs1*.** **A** Vergleich der Proteinsequenzen von Erg13 aus *S. cerevisiae* und Hcs1 aus *U. maydis*. Erg13 und Hcs1 zeigen 44 % Aminosäureidentität (identische Aminosäuren sind rot hervorgehoben). Gelb unterlegt ist das aktive Zentrum der HMG-CoA-Synthase, in der das mit einem Stern (\*) gekennzeichnete Cystein eine zentrale Rolle spielt. **B** Schematische Darstellung des *hcs1*-Lokus in *U. maydis* (oben) und des *pcrg1::hcs1*-Lokus nach Integration des *crg1*-Promotors. Als Selektionsmarker wurde die Hygromycinresistenzkassette verwendet.



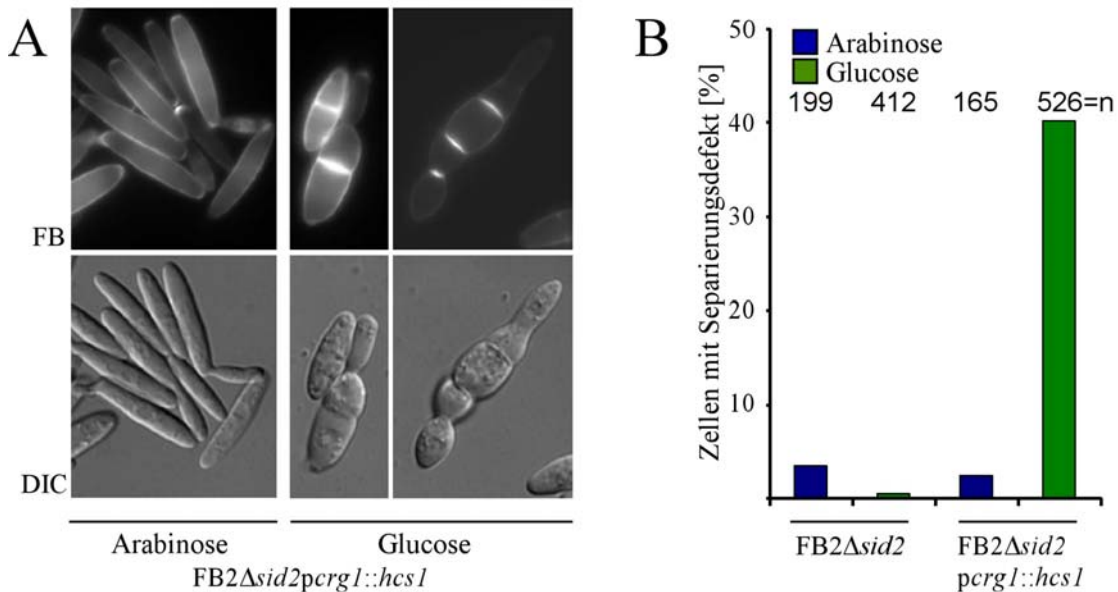
Für das Enzym Erg13 von *S. cerevisiae* konnte eine essentielle Bedeutung für die Synthese des Zellwandbestandteiles Ergosterol gezeigt werden (Grünler *et al.*, 1994). Eine Deletion von *erg13* ist lethal für *S. cerevisiae*. Da dies auch für Deletion von *hcs1* in *U. maydis* zu erwarten war, wurde stattdessen eine Promotorfusion hergestellt, durch die die Transkription des Genes *hcs1* unter die Kontrolle des induzierbaren Promotors *pcrg1* gestellt wurde (Abbildung 9B). Die Aktivität des *crg1*-Promotors wird durch die Zugabe von Arabinose zum Wachstumsmedium induziert und durch Glucose reprimiert. Das Fusionskonstrukt *pcrg1::hcs1* wurde in den Stamm FB2 $\Delta$ *sid2* transformiert. Dieser Ausgangsstamm synthetisiert nur Ferrichrom A

#### 2.1.1.5 Die Repression der HMG-CoA-Synthase Hcs1 führt zu einem Zellseparierungsdefekt

Um zu zeigen, dass die putative HMG-CoA-Synthase Hcs1 tatsächlich an der Herstellung von Zellwandbestandteilen beteiligt ist, wurden Kulturen der Mutante FB2 $\Delta$ *sid2pcrg1::hcs1* und des Kontrollstammes FB2 $\Delta$ *sid2* über Nacht in einem Arabinose-haltigem Medium angezogen. Unter diesen Bedingungen wird *hcs1* in beiden Stämmen exprimiert. Anschließend wurden die Kulturen in Glucose- bzw. Arabinose-haltiges Medium überführt. Die Inkubation in Glucose-haltigem Medium sollte zur Repression der HMG-CoA-Synthase Hcs1 in der Mutante FB2 $\Delta$ *sid2pcrg1::hcs1* führen. Zehn Stunden nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen der Mutante FB2 $\Delta$ *sid2pcrg1::hcs1* und des Kontrollstammes FB2 $\Delta$ *sid2* mikroskopisch untersucht (Abbildung 10A). Dazu wurde die Zellwand durch den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescence Brightener (FB) sichtbar gemacht.

Während die Zellen der Mutante FB2 $\Delta$ *sid2pcrg1::hcs1* bei Induktion von Hcs1 in Arabinose-haltigem Wachstumsmedium eine normale Zellmorphologie aufwiesen (Abbildung 10A, links), führte eine Repression der HMG-CoA-Synthase in Glucose-haltigem Medium zu einem Zellseparierungsdefekt (Abbildung 10A, rechts). Die Zellen rundeten sich deutlich ab und es kam zu einer Verdickung der Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle. Eine Quantifizierung dieses Defektes (Abbildung 10B) zeigte, dass 40 % aller Zellen der Mutante FB2 $\Delta$ *sid2pcrg1::hcs1* in Glucose-haltigem Medium nicht in der Lage waren, sich von der Mutterzelle zu trennen. Im Gegensatz

dazu trat ein Cytokinesedefekt bei Induktion von Hcs1 nur in 4 % der Zellen auf. Eine vergleichbare Häufigkeit von Zellen mit Separierungsdefekt zeigten auch der Kontrollstamm FB2 $\Delta$ sid2. Diese Experimente zeigen, dass es sich bei Hcs1 tatsächlich um die HMG-CoA-Synthase von *U. maydis* handelt, und dass ihre Repression im Stamm FB2 $\Delta$ sid2pcrg1::hcs1 zu einer Reduktion der Synthese von HMG-CoA und folglich zur verminderten Synthese von Ergosterol führt.



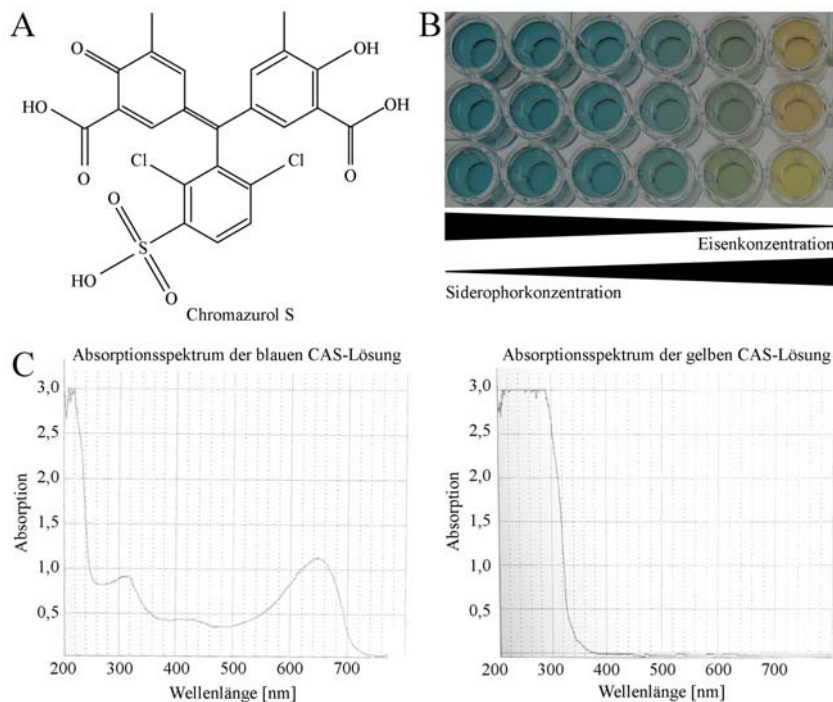
**Abbildung 10: Die Repression der HMG-CoA-Synthase Hcs1 führt zu einem Zellseparierungsdefekt.** **A** Zellmorphologie der Mutante FB2 $\Delta$ sid2pcrg1::hcs1 im Lichtmikroskop (DIC, untere Reihe) und nach der Färbung mit Fluorescent Brightener (FB, obere Reihe) zehn Stunden nach dem Mediumwechsel. Während die Mutante in Arabinose-haltigem Medium eine normale Morphologie aufwies, zeigten sie nach dem Wechsel von induzierenden (Arabinose) zu reprimierenden (Glucose) Bedingungen einen deutlichen Zellseparierungsdefekt. Die Zellen rundeten sich ab und waren nicht in der Lage, sich voneinander abzulösen. Die Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle waren verdickt. **B** Quantifizierung des Zellseparierungsdefektes 10 Stunden nach dem Mediumwechsel. In Arabinose-haltigem Medium zeigten weniger als 10 % der Zellen der Mutante FB2 $\Delta$ sid2pcrg1::hcs1 einen Zellseparierungsdefekt. Einen ähnlichen Anteil an Zellen mit Separierungsdefekt zeigte der Wildtyp in Glucose- und Arabinose-haltigem Medium. Im Gegensatz dazu führte die Repression der HMG-CoA-Synthase zu einem Separierungsdefekt bei nahezu 40 % aller Zellen. (FB: Fluorescent Brightener, DIC: „differential interference contrast“, n: Gesamtzahl der ausgezählten Zellen)

#### 2.1.1.6 Optimierung des CAS-Assays zur Quantifizierung von Siderophoren in Kulturüberständen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Hcs1 an der Synthese von HMG-CoA in *U. maydis* beteiligt ist, sollte nun der Beweis für die Richtigkeit des putativen Ferrichrom A-Biosyntheseweges (Abbildung 7) erbracht werden. Die Repression der HMG-CoA-Synthase Hcs1 im Stamm FB2 $\Delta$ sid2pcrg1::hcs1 durch Glucose sollte nicht nur zu einer Reduktion der Synthese von Ergosterol, sondern auch zu einer Verringerung der Ferrichrom A-Biosynthese führen. Bei Induktion des pcrg1-Promotors durch Arabinose sollte die Synthese von Ferrichrom A hingegen unbeeinflusst sein. Unter reprimierenden Bedingungen kann möglicherweise keine vollständige Repression erreicht werden. Dadurch sollte es nicht zum vollständigen Ausbleiben der HMG-CoA-Biosynthese kommen und die Synthese von Ferrichrom A mit geringer Ausbeute weiterhin erfolgen. Aus diesem Grund sollte eine quantitative Messung des Ferrichrom A-Gehaltes in Kulturüberständen der Mutante FB2 $\Delta$ sid2pcrg1::hcs1 unter induzierten und reprimierten Bedingungen erfolgen.

Bei der Aufreinigung mittels XAD16-Säulen geht ein Großteil der in den Kulturüberständen enthaltenen Siderophore verloren, was eine Quantifizierung mittels HPLC unmöglich macht. Daher wurde nach einer Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung des Siderophorgehaltes in Kulturüberständen gesucht, bei der keine vorherige Aufreinigung der Siderophore notwendig ist. Zu diesem Zweck wurde der sogenannte CAS-Assay für die Anwendung bei Flüssigkulturen optimiert. Chromazurol S (CAS, Abbildung 11A) ist ein Eisenchelator, der in seiner eisengebundenen Form eine Blaufärbung zeigt. CAS kann zur Detektion von Siderophoren verwendet werden (Schwyn und Neilands, 1987), da durch die Ablösung des Eisens aus dem Eisen-CAS-Komplex, z.B. durch die Zugabe von Siderophoren, ein Farbumschlag von Blau zu Gelb stattfindet (Abbildung 11B). Werden Mikroorganismen, die in der Lage sind Siderophore zu sekretieren, auf einer CAS-haltigen Agarplatte ausgestrichen, so zeigt sich ein gelber Ring um die Kolonien. In diesem Ring liegt das CAS in seiner eisenfreien Form vor. Die Größe dieses Ringes kann Aufschluss über die Menge der sekretierten Siderophore geben (Shin *et al.*, 2001).

Um quantitative Unterschiede in der Ferrichrom A-Biosynthese bei der Mutante FB2 $\Delta$ *sid2pcrg1::hcs1* unter reprimierenden Bedingungen im Vergleich zur Induktion von Hcs1 zu sehen, war dieser CAS-Platten-Ansatz jedoch ungeeignet, weil eine Messung des gelben Ringes um die Kultur zu ungenau ist. Außerdem müssten die Stämme zu lange auf den CAS-Platten wachsen.



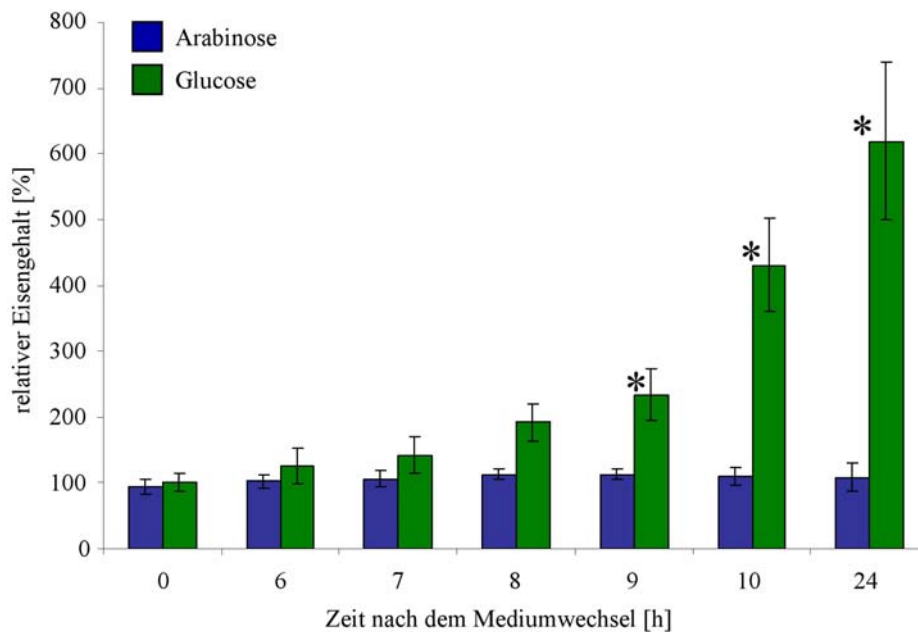
**Abbildung 11: Optimierung des CAS-Assays zur Quantifizierung von Siderophoren in Kulturüberständen.** **A** Strukturformel von Chromazurol S. **B** In seiner eisengebundenen Form zeigt der CAS-Komplex eine blaue Färbung. Durch Ablösung des Eisens durch Zugabe ansteigender Konzentrationen an Siderophoren kommt es zu einem Farbumschlag ins Gelbe. **C** Dieser Farbumschlag kann photometrisch analysiert werden, da sich die Absorptionsspektren des blauen und gelben CAS-Komplexes voneinander unterscheiden. Der eisengebundene CAS-Komplex hat ein Absorptionsmaximum bei 650 nm.

Der CAS-Assay wurde so abgewandelt, dass er eine quantitative Bestimmung des Ferrichrom A-Gehaltes in Überständen von Flüssigkulturen zuließ. Die Quantifizierung erfolgte in diesem Fall photometrisch durch Messung der Absorption der blauen eisenhaltigen Form des CAS (Abbildung 11C). Im eisengebundenen Zustand zeigte die CAS-Lösung eine hohe Absorption von Licht der Wellenlänge 650 nm (Abbildung 11B, Abbildung 11C links). Bei einem Stamm, der große Mengen Siderophore in das Medium sekretiert, lösen diese das Eisen aus der CAS-Lösung wenn sie mit Kulturüberständen gemischt wird. Dadurch kommt es zu einem

Farbumschlag ins Gelbe und folglich zu einer Verringerung der Absorption bei 650 nm (Abbildung 11B, Abbildung 11C rechts). Ein Stamm, der in der Siderophorsynthese beeinträchtigt ist, sekretiert weniger oder gar keine Siderophore. Dadurch bleibt die CAS-Lösung in ihrer eisengebundenen Form, und die Absorption bei 650 nm ist hoch. Die Messung der Absorption lässt also einen direkten Rückschluss auf den Eisen- und Siderophorgehalt von Kulturüberständen zu.

#### 2.1.1.7 HMG-CoA ist für die Ferrichrom A-Biosynthese essentiell

Um nachzuweisen, dass HMG-CoA als Vorstufe der Ferrichrom A-Biosynthese dient, wurden Kulturen der Mutante *FB2Δsid2pcrg1::hcs1* und des Kontrollstammes *FB2Δsid2* über Nacht in einem Arabinose- und Eisen-haltigen Medium angezogen. Unter diesen Bedingungen wurde die HMG-CoA-Synthase exprimiert; die Synthese von Siderophoren war auf Grund des hohen Eisengehaltes im Medium nicht nötig. Anschließend wurden die Kulturen in Glucose- bzw. Arabinose-haltiges Eisenmangelmedium überführt. Dabei wurden die Kulturen auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt und für weitere 24 Stunden bei 28°C inkubiert. Zu Beginn des Experimentes, sowie nach sechs, sieben, acht, neun, zehn und vierundzwanzig Stunden nach dem Mediumwechsel wurde die optische Dichte der Kulturen bestimmt und eine Probe des Kulturüberstandes genommen. Der Eisengehalt und damit indirekt der Siderophorgehalt dieser Kulturüberstände wurde mittels des CAS-Assays bestimmt (Abbildung 12). Für die Quantifizierung des Eisengehaltes wurden die Kulturüberstände der Stämme *FB2Δsid2* und *FB2Δsid2pcrg1::hcs1* mit einer CAS-Lösung gemischt und die Absorptionskapazität dieses Gemisches photometrisch bestimmt. Anschließend wurden die Absorptionswerte auf die optische Dichte der Kulturen normalisiert und der Quotient aus den OD-normalisierten Absorptionswerten der Mutante *FB2Δsid2pcrg1::hcs1* und den Werten des Kontrollstammes *FB2Δsid2* gebildet. Diese Berechnung erfolgte jeweils für die Kulturen in Arabinose- bzw. in Glucose-haltigem Medium. Dadurch konnte der relative Eisengehalt der Mutante *FB2Δsid2pcrg1::hcs1* unter induzierenden bzw. reprimierenden Bedingungen berechnet werden. Der Wert von *FB2Δsid2* wurde gleich 100% gesetzt.



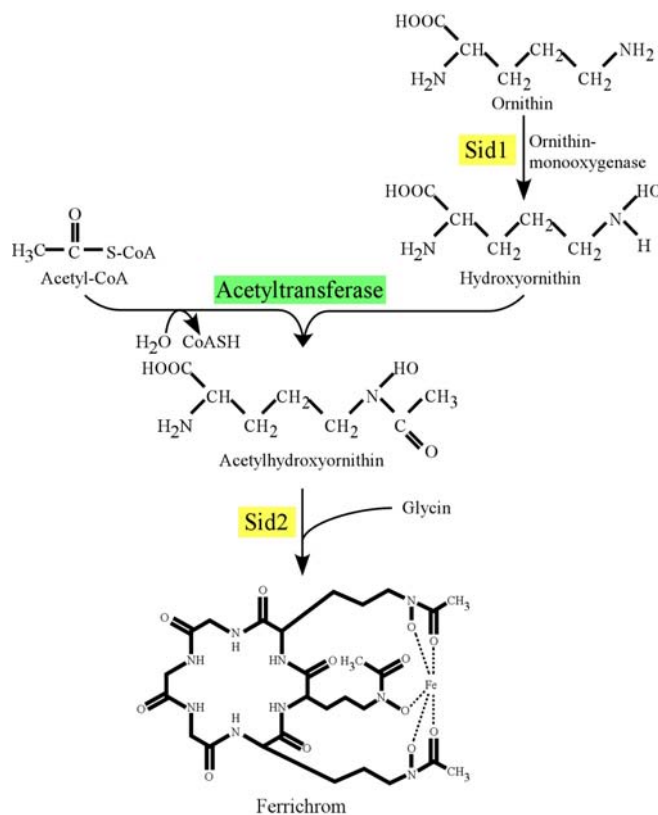
**Abbildung 12: Die Expression der HMG-CoA-Synthase *Hcs1* ist essentiell für die Synthese von Ferrichrom A.** Die Stämme *FB2Δsid2* und *FB2Δsid2pcrg1::hcs1* wurden in Eisenmangelmedium mit Arabinose bzw. Glucose als einzige Kohlenstoffquelle überführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation wurden die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) und der freie Eisengehalt mittels CAS-Analyse bestimmt. Der Gehalt an freiem Eisen der Mutante *FB2Δsid2pcrg1::hcs1* wurde ins Verhältnis zu dem des Kontrollstammes *FB2Δsid2* gesetzt. Während der relative freie Eisengehalt der Mutante in Arabinose-haltigem Medium dem des Wildtyps entsprach, stieg er in Glucose-haltigem Medium mit der Zeit immer weiter an. Nach neun Stunden bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Kulturen in Arabinose und Glucose (gekennzeichnet durch \*). Dies ließ darauf schließen, dass die Repression der HMG-CoA-Synthase die Produktion von Ferrichrom A inhibierte. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels Student-t-Test. Dabei wurde jeweils der Absorptionswert der Mutante *FB2Δsid2pcrg1::hcs1* in Glucose mit dem Wert in Arabinose verglichen. Das Experiment wurde mit biologischen Triplikaten durchgeführt.

Es ist deutlich erkennbar, dass der relative Eisengehalt von *FB2Δsid2pcrg1::hcs1* in Arabinose-haltigem Medium zu allen Zeitpunkten dem des Kontrollstammes entsprach (Abbildung 12). Die Ferrichrom A-Synthese war also unter induzierenden Bedingungen im Stamm *FB2Δsid2pcrg1::hcs1* nicht beeinträchtigt und erfolgte im gleichen Maße wie im Kontrollstamm *FB2Δsid2*. Im Gegensatz dazu stieg der relative Eisengehalt der Mutante *FB2Δsid2pcrg1::hcs1* unter reprimierenden Bedingungen in glucosehaltigem Medium mit der Zeit immer stärker an. Nach neun Stunden war der Unterschied zwischen den Kulturen in Arabinose und Glucose signifikant (durch einen Stern gekennzeichnet). Ein Anstieg des relativen Gehaltes an freiem Eisen in den Kulturüberständen bedeutet eine Verringerung des Ferrichrom A-Gehaltes. Wird

also die Expression der HMG-CoA-Synthase durch die Zugabe von Glucose reprimiert, synthetisiert die Mutante signifikant weniger Ferrichrom A als unter induzierenden Bedingungen. Damit konnte gezeigt werden, dass HMG-CoA tatsächlich als Vorstufe für die Ferrichrom A-Biosynthese fungiert, was den hypothetischen Ferrichrom A-Biosyntheseweg (Abbildung 7) stützt.

### 2.1.2 Ferrichrom-Biosynthese

Die Synthese von Ferrichrom ist bereits weitgehend aufgeklärt (Mei *et al.*, 1993, Yuan *et al.*, 2001). Auch sie beginnt mit der Hydroxylierung von Ornithin durch Sid1. Hydroxyornithin muss anschließend acetyliert werden. Drei Acetylhydroxyornithin-Moleküle werden dann mit drei Glycinresten durch die NRPS Sid2 zu Ferrichrom zyklisiert (Abbildung 13). Lediglich das Enzym, das die Acetylierung von Hydroxyornithin zu Acetylhydroxyornithin catalysiert, ist noch unbekannt.



**Abbildung 13: Putativer Ferrichrom-Biosyntheseweg.** Die Biosynthese von Ferrichrom beginnt mit der Hydroxylierung von Ornithin durch Sid1. Drei Hydroxyornithin-Moleküle werden anschließend acetyliert und mit drei Glycinresten durch die NRPS Sid2 zu Ferrichrom zyklisiert. Lediglich die Enzyme zur Acetylierung von Hydroxyornithin zu Acetylhydroxyornithin sind bislang uncharakterisiert. Gelb unterlegt sind die bereits identifizierten Enzyme Sid1 und Sid2, während das Enzym, das die Acetylierung von Hydroxyornithin katalysiert, noch nicht bekannt ist (grün unterlegt).

## 2.1.2.1 Identifikation putativer Acetyltransferasen

Da bisher in keinem Pilz eine Hydroxyornithin-Acetyltransferase identifiziert werden konnte, wurden Genomvergleiche für die Identifikation solcher Enzyme verwendet. Dazu wurde zunächst im Genom von *U. maydis* nach Proteinen gesucht, die eine Acetyltransferasedomäne enthalten. Diese Suche ergab eine Liste von 31 Genen (nicht gezeigt). Da es sich bei der Acetylierung von Hydroxyornithin um eine N-Acetylierung handelt, wurden alle Enzyme ausgeschlossen, die als O-Acetyltransferasen bzw. als Histonacetyltransferasen annotiert sind. Durch diese Analyse blieben noch acht Gene als mögliche Kandidaten für die Acetylierung von Hydroxyornithin übrig (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Identifikation von Kandidatengenen für Acetyltransferasen in *U. maydis*.\***

Protein aus <i>U. maydis</i>	Homolog in				Name
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>	
	Name AS-Identität**	Name AS-Identität**	Name AS-Identität**	Name AS-Identität**	
um01533	YEL066W 20%	SPAC1002.07C 37,20%	AN24793 42,20%	Afu4g0298 39%	Act1
um01576	YOL018C 9,10%		AN10723.3 22,30%	Afu4g1093 22,30%	Act2
um05789	YPR193C 15,20%	SPCC825.04C 17,10%			Act3
um10032	YPL019W 12,30%	SPBC577.03C 31,20%	AN10478.3 30,70%	Afu4g0798 26,90%	Act4
um00579	YDL040C 26%				
um01623	YPR051W 31,20%				
um04277	YPR131C 36,20%				
um11318	YHR013C 38,10%				

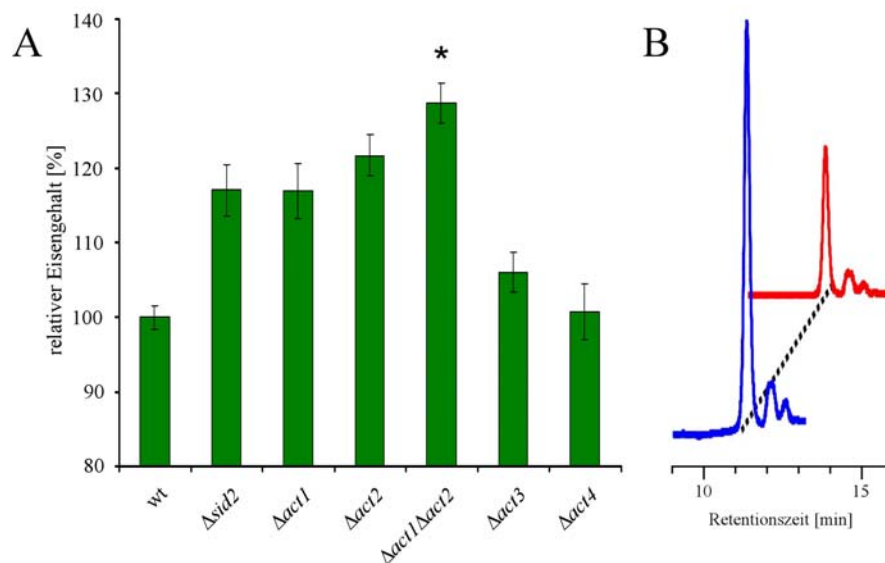
\* Im Genom von *U. maydis* gibt es acht Gene, die eine O-Acetyltransferasedomäne enthalten. Für um00579, um01623, um04277 und um11318 finden sich homologe Proteine im Genom von *S. cerevisiae*, deren Aminosäureidentität größer als 20 % ist. Im Fall von um01533 (Act1), um01576 (Act2), um05789 (Act3) und um10032 (Act4) finden sich keine Homologe in *S. cerevisiae*, aber in mindestens einem der drei Pilze *S. pombe*, *A. nidulans* und *A. fumigatus*, die alle Acetylhydroxyornithin herstellen können.

\*\* Aminosäure-Identität

Um die Zahl der Kandidaten weiter zu reduzieren, wurden alle Gene ausgeschlossen, die aufgrund von BlastP-Analysen im Genom von *S. cerevisiae* vorkommen.



Bäckerhefe ist nicht in der Lage, Siderophore zu synthetisieren und benötigt aller Voraussicht nach kein Enzym für die Acetylierung von Hydroxornithin. Für vier der acht Kandidaten aus *U. maydis* fanden sich keine homologen Proteine in *S. cerevisiae*, deren Aminosäureidentität über 20 % lag (Tabelle 1). Im Gegensatz dazu fanden sich zu diesen vier Enzymen Homologe in *S. pombe*, *A. nidulans* und *A. fumigatus* mit Aminosäureidentitäten von 17 % bis 42 % (Tabelle 1). Diese drei Pilze produzieren wie *U. maydis* Siderophore und nutzen dazu ebenfalls acetyliertes Hydroxyornithin als Baustein (Schrettl, M. *et al.*, 2004a, Eisendle *et al.*, 2003, Schrettl *et al.*, 2007). Durch diese Genomvergleiche konnte die Zahl der möglichen Acetyltransferasen auf vier eingegrenzt werden. Die Gene um01533, um01576, um05789 und um10032 wurden daher als *act1*, *act2*, *act3* und *act4* für Acetyltransferasen 1 bis 4 bezeichnet (Tabelle 1). Es wurden Deletionsmutanten von *act1* bis *act4* im Stamm FB2 von *U. maydis* hergestellt. Eine Analyse des Ferrichromgehaltes in Kulturüberständen dieser Mutanten mittels HPLC zeigte jedoch, dass alle vier Mutanten in der Lage waren, Ferrichrom zu synthetisieren (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 14: Die Acetyltransferasen Act1 und Act2 sind an der Ferrichrom-Biosynthese beteiligt.** **A.** Mutanten der vier putativen Acetyltransferasen *act1*, *act2*, *act3* und *act4* und der Wildtyp FB2 wurden in Eisenmangelmedium angezogen und der relative Eisengehalt der Kulturüberstände gemessen. Während alle Einzelmutanten nur einen wenig erhöhten relativen Eisengehalt zeigten, war dieser in der Doppelmutante FB2 $\Delta act1 \Delta act2$  signifikant erhöht (\*), was auf einen signifikant niedrigeren Ferrichrom-Gehalt schließen ließ. Für die Berechnung der Signifikanz wurden die relativen Eisengehalte aller Stämme mittels Anova-Test miteinander verglichen. **B.** Die Doppelmutante FB2 $\Delta act1 \Delta act2$  (rot, im Hintergrund) war wie der Wildtyp FB2 (blau, im Vordergrund) in der Lage Ferrichrom zu synthetisieren, wie mittels HPLC-Analysen gezeigt werden konnte.

Dies könnte durch eine funktionelle Redundanz der untersuchten Enzyme hervorgerufen werden. Deshalb wurde untersucht, ob die Acetyltransferase-Mutanten einen quantitativ geringeren Ferrichrom-Gehalt in Kulturüberständen aufweisen. Eine Quantifizierung des relativen Eisengehaltes durch den CAS-Assay zeigte, dass die Mutanten FB2 $\Delta act1$  und FB2 $\Delta act2$  deutlich weniger Siderophore produzieren als der Wildtyp (Abbildung 14A). Act1 und Act2 sind also an der Ferrichromsynthese beteiligt und haben dabei eine redundante Funktion. Um zu testen, ob Act1 und Act2 die einzigen Acetyltransferasen darstellen, die an der Ferrichrom-Biosynthese beteiligt sind, wurde eine FB2 $\Delta act1\Delta act2$ -Doppelmutante im FB2-Hintergrund hergestellt. Die Doppelmutante FB2 $\Delta act1\Delta act2$  zeigte einen signifikant höheren Eisengehalt und damit signifikant geringeren Siderophorgehalt als der Wildtyp FB2 (Abbildung 14A). Da auch diese Doppelmutante nicht vollständig in der Ferrichrombiosynthese beeinträchtigt war, wie durch HPLC-Analysen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 14B), kann postuliert werden, dass ein weiteres Enzym die Acetylierung von Hydroxyornithin katalysieren kann. Hier käme beispielsweise Act3 in Betracht, dessen Deletion zu einer Verringerung des Siderophorgehaltes um knapp 10% führte (Abbildung 14A).

Mit den oben beschriebenen Versuchen ist es gelungen, für alle Syntheseschritte von Ferrichrom und Ferrichrom A Enzyme in *U. maydis* zu identifizieren. Es konnte sechs neue Enzyme identifizieren, die an der Siderophorbiosynthese beteiligt sind. Act1 und Act2 sind für die Acetylierung von Hydroxyornithin notwendig. An der Generierung von  $\Delta^2$ -Methylglutaconylhydroxyornithin aus Hydroxyornithin und  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA sind Fer4 und Fer5 beteiligt. Fer4 verwendet dafür Hydroxymethylglutaryl-CoA, das von Hcs1 aus Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA gebildet wird. Bislang unbekannt ist, welche essentielle Funktion Fer8 während der Ferrichrom A-Biosynthese erfüllt.

## 2.2 Siderophortransport in *U. maydis*

Für die Aufnahme von Eisen mittels Siderophoren ist deren Sekretion in die Umgebung und anschließende Wiederaufnahme unerlässlich. *U. maydis* ist in der Lage,  $^{55}\text{Fe}$ -markiertes Ferrichrom aufzunehmen (Ardon *et al.*, 1997). Welcher Transporter in der Cytoplasmamembran diese Aufgabe übernehmen könnte, war bisher unbekannt. Außerdem war bisher nicht untersucht worden, welche Proteine von *U. maydis* die Siderophore in die Umgebung exportieren könnten.

### 2.2.1 Siderophorimport

#### 2.2.1.1 Identifikation putativer Siderophortransporter von *U. maydis*

Im Eisen- und Urbs1-regulierten Gencluster auf Chromosom II (Abbildung 3) finden sich zwei Gene, *fer6* und *fer7*, die als Transporter annotiert sind. Diese beiden Gene stellten daher zwei mögliche Siderophortransporter dar. Für die Identifikation weiterer Kandidatengene wurden Genomvergleiche mit *S. cerevisiae* durchgeführt. *S. cerevisiae* synthetisiert keine eigenen Siderophore, ist aber in der Lage, ein weites Spektrum an Siderophoren anderer Organismen aufzunehmen und dadurch den eigenen Eisenbedarf zu decken. Zu diesem Zweck besitzt Hefe vier Siderophortransporter: Arn1p, Arn2p, Arn3p und Arn4p, wobei Arn1p Ferrichrom und Ferrichrom A importieren kann (Yun *et al.*, 2000a). Im Genom von *U. maydis* fanden sich drei Gene, um04410, um06349 und um05114, die für Proteine mit 25 %, 15 % bzw. 17 % Aminosäureidentität zu Arn1p, codieren. Das Kandidatengen um05114 ist als Transporter annotiert ist und wird wie *fer6* und *fer7* eisenabhängig über Urbs1 reguliert (Eichhorn *et al.*, 2006). Allerdings liegt das Gen um05114 nicht in einem der Eisen-regulierten Gencluster. Die drei Kandidatengene um04410, um06349 und um05114 werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als *cim1-3* für Candidate for siderophore import bezeichnet.

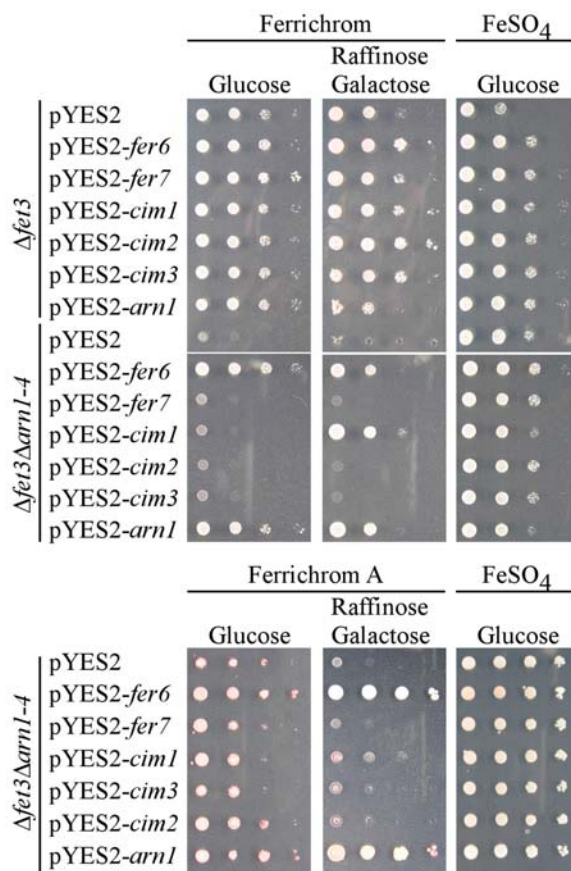
### 2.2.1.2 Fer6 und Cim1 sind Siderophorimporter

Für die Analyse der putativen Siderophortransporter Fer6, Fer7, Cim1, Cim2 und Cim3 hinsichtlich ihrer Siderophorimportaktivität wurde ein Hefekomplementationsversuch verwendet. Eine Hefemutante, der alle vier Siderophortransporter Arn1-4p und die Eisenoxidase Fet3p fehlen, ist nicht in der Lage auf Eisenmangelmedium zu wachsen. Durch die Expression eines Siderophorimporters in der Mutante  $\Delta fet3\Delta arn1\Delta arn2\Delta arn3\Delta arn4$  kann ihr Wachstumsdefekt komplementiert werden. Um die identifizierten putativen Siderophortransporter auf ihre Funktion als Importer zu testen, wurden die offenen Leserahmen für *fer6*, *fer7*, *cim1*, *cim2*, *cim3*, *cim4* und *arn1* einzeln in das Plasmid pYES2 kloniert und in den Stamm  $\Delta fet3\Delta arn1-4$  von *S. cerevisiae* transformiert. Die Expression der Kandidatengene wurde durch den Galaktose-induzierbaren *gal1*-Hefepromotor reguliert. Das Plasmid pYES2-*arn1* diente als Positivkontrolle. Um sicherstellen zu können, dass keines der exprimierten Proteine schädigend auf das Wachstum von Hefe wirkt, wurden alle Plasmide ebenfalls in den *S. cerevisiae* Stamm  $\Delta fet3$  transformiert.

Die erhaltenen Hefetransformanten wurden auf Ferrichrom- und Ferrichrom A-haltige Platten aufgetropft, die als Kohlenstoffquelle entweder Glucose enthielten, die zu einer Repression des *gal1*-Promotors führt, oder Galaktose für die Induktion der Expression (Abbildung 15). Die Expression der Gene *fer6* und *cim1*, sowie der Kontrolle *arn1*, führte zu Wachstum der Stämme auf Ferrichrom-Galaktose-Platten (Abbildung 15 oben). Fer6 und Cim1, sowie das Kontrollprotein Arn1p, vermittelten also die Aufnahme von Ferrichrom, wodurch das Wachstum der Hefestämme  $\Delta fet3\Delta arn1-4$  mit pYES2-*fer6*, pYES2-*cim1* bzw. pYES2-*arn1* ermöglicht wurde. Dabei vermittelten Fer6 und Arn1 bereits auf dem Glucose-haltigen Medium die Aufnahme von Ferrichrom. Dies war darauf zurückzuführen, dass der *gal1*-Promotor nicht vollständig reprimiert zu sein scheint. Bereits eine geringe Expression der Siderophortransporter Fer6 und Arn1 scheint für den Transport von Ferrichrom auszureichen und die Deckung des Eisenbedarfs zu gewährleisten. Für Arn1 ist bekannt, dass er eine sehr hohe Affinität für Ferrichrom hat ( $K_m 2,3 \times 10^{-6}$  M, Yun *et al.*, 2000a). Fer6 scheint eine ähnlich hohe Affinität für Ferrichrom aufzuweisen. Cim1 hingegen scheint eine geringere Affinität für Ferrichrom zu besitzen, da nur

nach Induktion durch Galaktose Wachstum der Hefedeletionsmutante  $\Delta fet3\Delta arn1-4$  mit pYES2-*cim1* beobachtet werden kann (Abbildung 15 oben).

Auf Ferrichrom A-haltigen Platten vermittelte Fer6 wie Arn1p die Fähigkeit, unter Eisenmangelbedingungen zu wachsen. Auch die Expression von Cim1 führte zu einem leichten Wachstum auf Ferrichrom A-haltigen Platten. Beide Importer scheinen also in der Lage, sowohl Ferrichrom als auch Ferrichrom A zu transportieren (Abbildung 15 unten).

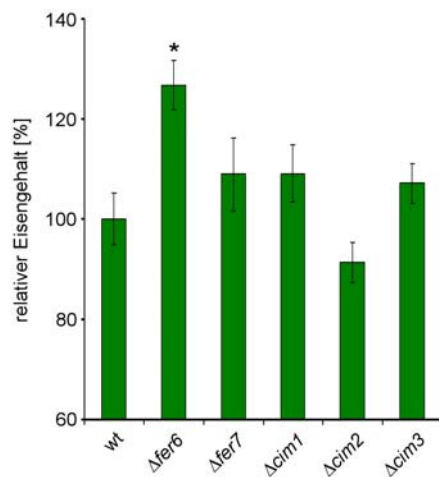


**Abbildung 15: Fer6 und Cim1 sind Siderophorimporter.** Durch die Expression eines Siderophorimporters kann der Wachstumsdefekt der Hefemutante  $\Delta fet3\Delta arn1-4$  auf Siderophor-haltigen Platten komplementiert werden. Um zu testen, ob die Siderophor-transporterkandidaten Fer6, Fer7, Cim1, Cim2 und Cim3 die Aufnahme von Ferrichrom bzw. Ferrichrom A vermitteln, wurden die offenen Leserahmen dieser Gene in das Plasmid pYES2 kloniert. Galaktose induziert und Glucose reprimiert die Expression der Kandidatengene. Die Expression der Gene *fer6* und *cim1*, sowie der Kontrolle *arn1*, führte zu Wachstum der Mutante  $\Delta fet3\Delta arn1-4$  auf Ferrichrom- und Ferrichrom A-haltigen Eisenmangelplatten.

### 2.2.2 Fer6 ist ein Siderophorexporter

Bisher ist für keinen Pilz ein Siderophorexporter beschrieben worden. Daher war es von besonderem Interesse, die Sekretion von Ferrichrom und Ferrichrom A in *U. maydis* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Deletionsmutanten von *fer6*, *fer7*, *cim1*, *cim2* und *cim3* im FB2-Hintergrund von *U. maydis* hergestellt. Diese Stämme wurden über Nacht in Eisenmangelmedium inkubiert und der Gehalt der in

das Medium sekretierten Siderophore mittels des CAS-Assays analysiert (Abbildung 16). Diese Analyse zeigte, dass Kulturüberstände der Mutante *FB2Δfer6* einen um 27 % erhöhten durchschnittlichen freien Eisengehalt enthielten. Dies ließ darauf schließen, dass die *FB2Δfer6*-Mutante in ihrer Siderophorsekretion beeinträchtigt war. Fer6 stellt damit den ersten beschriebenen pilzlichen Siderophorexporter dar.



**Abbildung 16: Fer6 ist ein Siderophorexporter.**

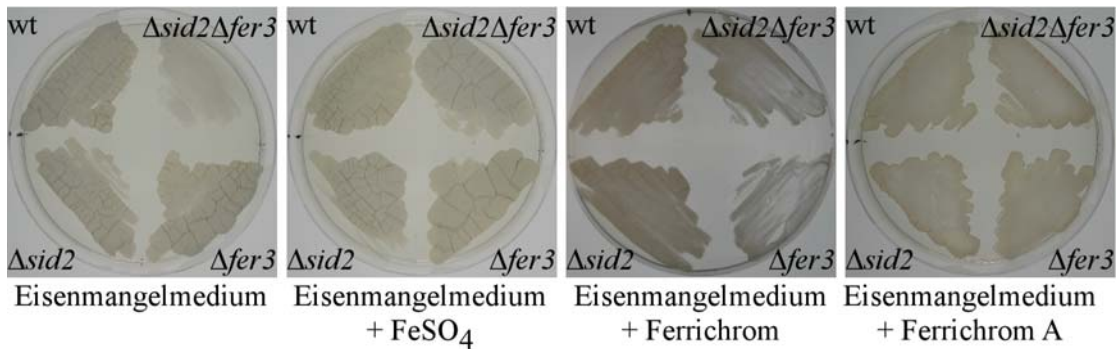
Analysen des freien Eisengehaltes in Kulturüberständen mittels CAS-Assay ergaben, dass die Mutante *FB2Δfer6* einen um 27 % erhöhten Eisengehalt gegenüber dem Wildtyp aufwies, während in den Überständen der Mutanten *FB2Δcim1*, *FB2Δcim2* und *FB2Δcim3* ein zum Wildtyp vergleichbarer Eisengehalt gemessen werden konnte.

### 2.3. Die Bedeutung der Siderophore für *U. maydis*

Nachdem die Biosynthese von Ferrichrom und Ferrichrom A aufgeklärt werden konnte und Transporter für ihren Ex- und Import identifiziert werden konnten, sollte untersucht werden, in welchen Phasen des Lebenszyklus von *U. maydis* die Siderophore eine Rolle spielen.

#### 2.3.1 Siderophore sind essentiell für das Wachstum von *U. maydis* in axenischer Kultur

Um die Bedeutung der Siderophore für *U. maydis* zu untersuchen, wurde eine *U. maydis*-Mutante hergestellt, die aufgrund des Fehlens der beiden NRPS Sid2 und Fer3 keine Siderophore synthetisieren kann. Diese Doppelmutante FB2 $\Delta$ sid2 $\Delta$ fer3 und die Stämme FB2 $\Delta$ sid2 und FB2 $\Delta$ fer3, die jeweils noch eines der beiden Siderophore synthetisieren können, sowie der Wildtyp FB2 wurden auf Eisenmangelmedium (CM-Glucose) ausgestrichen, das mit FeSO<sub>4</sub>, Ferrichrom bzw. Ferrichrom A supplementiert wurde (Abbildung 17). Außerdem wurden die Kulturen auf nicht supplementiertem Eisenmangelmedium (CM-Glucose) ausgestrichen. Auf nicht supplementiertem Eisenmangelmedium zeigte die Doppelmutante FB2 $\Delta$ sid2 $\Delta$ fer3 eine Wachstumsreduktion. Im Gegensatz dazu waren die Einzelmutanten FB2 $\Delta$ sid2 und FB2 $\Delta$ fer3 in der Lage wie der Wildtyp FB2 auf Eisenmangelmedium zu wachsen. Die Wachstumsreduktion der Doppelmutante FB2 $\Delta$ sid2 $\Delta$ fer3 konnte durch die Zugabe von Eisensulfat oder die Supplementierung mit Ferrichrom oder Ferrichrom A komplementiert werden (Abbildung 17). Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass Siderophore wichtig für das Wachstum in axenischer Kultur unter Eisenmangel sind, und dass bereits eines der beiden Siderophore ausreichend ist, um optimale Wachstumsbedingungen unter Eisenmangel zu schaffen.



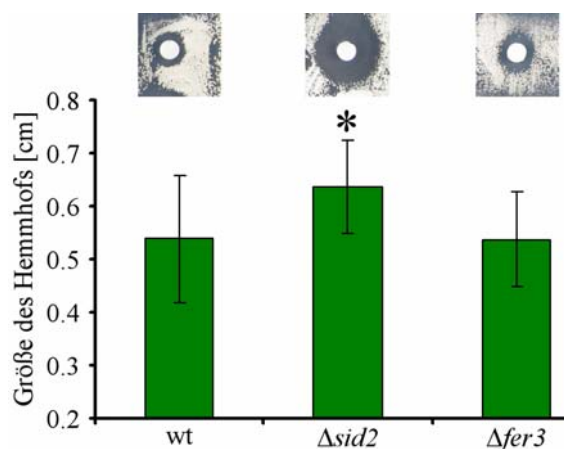
**Abbildung 17: Siderophore sind wichtig für das Wachstum in axenischer Kultur.** Die Doppelmutante FB2 $\Delta$ sid2 $\Delta$ fer3 zeigte ein reduziertes Wachstum auf Eisenmangelmedium. Diese Wachstumsreduktion konnte durch die Zugabe von Eisen oder Siderophoren komplementiert werden. Mutanten, die entweder Ferrichrom (FB2 $\Delta$ fer3) oder Ferrichrom A (FB2 $\Delta$ sid2) synthetisieren können, waren in ihrem Wachstum unter Eisenmangelbedingungen nicht beeinträchtigt.

### 2.3.2 Ferrichrom dient als Eisenspeicher im Cytoplasma und schützt vor oxidativem Stress, der durch freies Eisen ausgelöst wird

Eine hohe Konzentration an freiem Eisen in der Zelle kann zu oxidativem Stress führen, da durch die sogenannte Fenton-Reaktion freie Radikale entstehen können. Diese können schädlich auf Lipide, Aminosäuren und besonders auf DNA wirken. Daher ist es wichtig, die Akkumulation von freiem Eisen in der Zelle zu verhindern. Ferrichrom und Ferrichrom A könnten daher als Eisenspeicher in *U. maydis* wirken und somit eine protektive Wirkung gegen oxidativen Stress haben. Eine solche Funktion konnte bereits Ferricrocin, dem Eisenspeicher-Siderophor von *A. nidulans*, zugeschrieben werden (Eisendle *et al.*, 2003). Um eine protektive Wirkung der Siderophore in *U. maydis* nachzuweisen, wurden die Deletionsmutanten FB2 $\Delta$ sid2 und FB2 $\Delta$ fer3 sowie der Wildtyp FB2 über Nacht in Eisenmangelmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pāzipitiert und auf Eisenmangelmedium (AMM) ausplattiert. Auf diese Platten wurden Filterpapiere aufgelegt, die mit einer 1%igen Wasserstoffperoxidlösung getränkt wurden (Abbildung 18). Nach zweitägiger Inkubation wurde die Größe der Hemmhöfe der drei Stämme um die Filterpapiere gemessen. Je sensibler ein Stamm auf den oxidativen Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagiert, desto größer ist der Hemmhof. Die Deletionsmutante FB2 $\Delta$ fer3 zeigte in diesem Versuch Hemmhöfe mit einer durchschnittlichen Größe von  $0,54 \pm 0,12$  cm. Die



gleiche durchschnittliche Größe des Hemmhofs ( $0,54 \pm 0,09$  cm) zeigte auch der Wildtyp FB2. Im Gegensatz dazu war die Deletionsmutante FB2 $\Delta fer3$ , die kein Ferrichrom synthetisieren kann, deutlich stärker im Wachstum gehemmt und zeigte Hemmhöfe mit einer durchschnittlichen Größe von  $0,64 \pm 0,09$  cm (Abbildung 18). Mittels Anova-Test konnte gezeigt werden, dass dieser Größenunterschied statistisch signifikant ist. Die Speicherung des freien Eisens durch die Bindung an Ferrichrom scheint also wichtig für den Schutz vor oxidativem Stress zu sein. Daraus kann geschlossen werden, dass Ferrichrom, aber nicht Ferrichrom A, eine Rolle für die Eisenspeicherung im Cytoplasma zukommt.



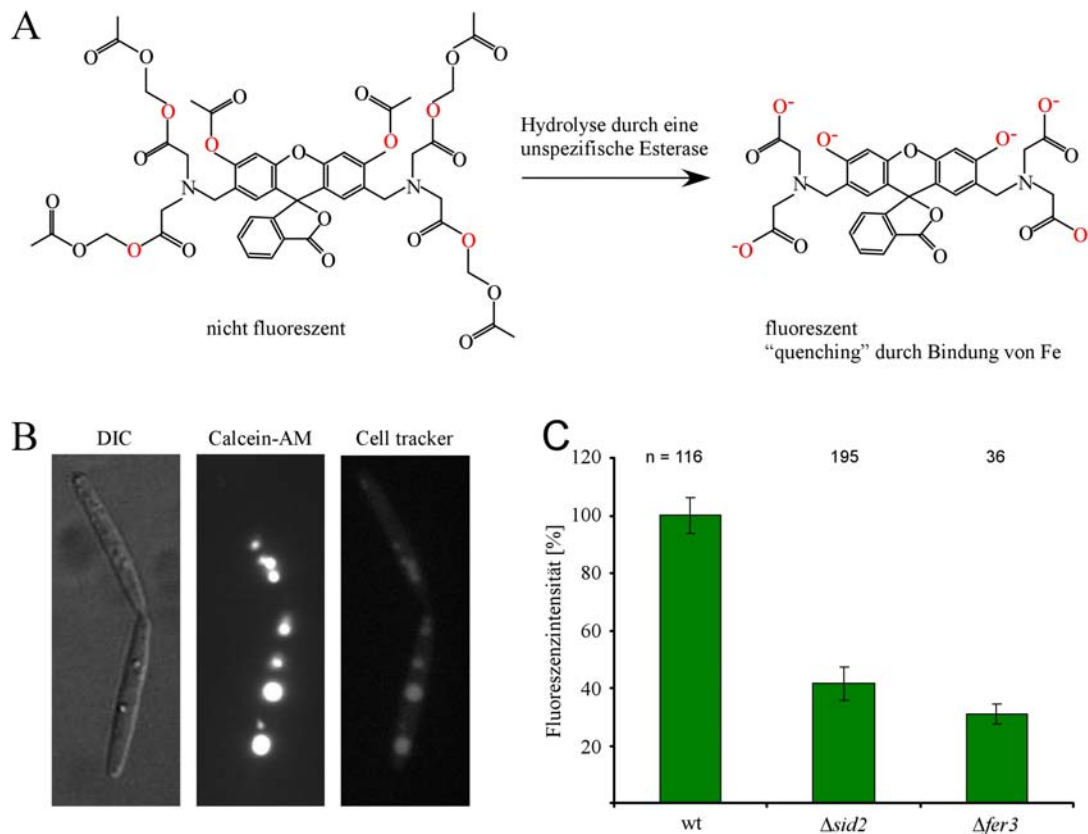
**Abbildung 18: Die Deletionsmutante FB2 $\Delta sid2$  ist sensitiv gegenüber oxidativem Stress.** Der Wildtyp FB2 und die Deletionsmutanten FB2 $\Delta sid2$  und FB2 $\Delta fer3$  wurden auf Eisenmangelmedium ausplattiert. Auf diese Platten wurden Filterpapiere aufgelegt, die mit einer 1%igen  $H_2O_2$ -Lösung getränkt wurden. Nach zweitägiger Inkubation wurde die Größe des Hemmhofes gemessen. Die Hemmhöfe der Mutante FB2 $\Delta sid2$  waren signifikant größer (gekennzeichnet durch den Stern), wie durch Anova-Analysen gezeigt werden konnte.

### 2.3.3 Ferrichrom und Ferrichrom A dienen als Eisenspeicher in den Vakuolen

Nachdem Ferrichrom eine mögliche Funktion als Eisenspeicher im Cytoplasma zugeschrieben werden konnte, stellte sich die Frage, ob es zu einer Akkumulation von freiem Eisen in den Zellen kommt, wenn keine Siderophore als Eisenspeicher bereitgestellt werden können. Um freies Eisen in den Zellen von *U. maydis* sichtbar machen zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM verwendet (Breuer *et al.*, 1995a und b, Thomas *et al.*, 1999). Calcein-AM ist in seiner eisenfreien Form

membranpermeabel und fluoresziert nicht (Abbildung 19A). Durch die Aktivität einer unspezifischen Esterase in der Zelle verliert es seine Membranpermeabilität und kann folglich keine weitere Membran mehr überwinden. Dadurch kommt es zur Akkumulation des Farbstoffes in dem Zellkompartiment, in dem diese Esterase aktiv ist. Außerdem wird Calcein-AM durch die Abspaltung der Estergruppen fluoreszent. Durch Bindung an Eisen kommt es zum sogenannten „quenching“, d.h. einer Reduktion der Fluoreszenzintensität. Je mehr freies Eisen also in diesem Zellkompartiment vorliegt, desto geringer ist die Fluoreszenz von Calcein-AM. Calcein-AM wurde bereits für die Analyse der Bedeutung der Siderophore von *A. nidulans* erfolgreich verwendet (Eisendle *et al.*, 2003). In Fall von *A. nidulans* akkumuliert Calcein-AM im Cytoplasma, wird also dort durch eine Esterase gespalten. Bei Mutanten von *A. nidulans*, die kein Ferricrocin herstellen können, kommt es zu einer Reduktion der Calcein-AM-Fluoreszenz, was auf das Vorhandensein freien Eisens im Cytoplasma und die wichtig Rolle von Ferricrocin für die Eisenspeicherung im Cytoplasma von *A. nidulans* schließen lässt.

Um zu untersuchen, ob es in Siderophorbiosynthese-Mutanten von *U. maydis* zu einer Akkumulation von freiem Eisen kommt, wurden die Mutanten FB2 $\Delta$ *sid2* und FB2 $\Delta$ *fer3* sowie der Wildtyp FB2 über Nacht in Eisenmangelmedium inkubiert, das mit 2  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> supplementiert wurde. Diese geringe Eisenkonzentration sollte zur Expression der Siderophorbiosynthesegene führen (Budde und Leong, 1989) und dennoch hoch genug sein, um eine Akkumulation freien Eisens in den Zellen zu ermöglichen, falls die Siderophore als Eisenspeicher benötigt werden. Anschließend wurden die Zellen mit einer Calcein-AM-Lösung behandelt und mikroskopisch untersucht (Abbildung 19B). In *U. maydis* kam es zu einer Lokalisation von Calcein-AM in den Vakuolen, wie durch eine Gegenfärbung mit dem Vakuolenfarbstoff Cell tracker blue gezeigt werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass Calcein-AM nicht im Cytoplasma von *U. maydis* gespalten wird und daher in die Vakuolen gelangen kann. Erst dort kommt es vermutlich zu einer Abspaltung der Estergruppen durch unspezifische Esterasen. Daher kann nur der freie Eisengehalt in den Vakuolen, nicht aber im Cytoplasma, quantifiziert werden.



**Abbildung 19: Ferrichrom und Ferrichrom A dienen als Eisenspeicher in den Vakuolen.**

**A** Strukturformel von Calcein-AM. Die nicht fluoreszente Form von Calcein-AM ist membranpermeabel und wird durch die Aktivität einer unspezifischen Esterase gespalten. Dadurch verliert es seine Membranpermeabilität und wird fluoreszent. Durch die Bindung an freies Eisen kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität („quenching“). **B** Calcein-AM (Mitte) lokalisiert in den Vakuolen von *U. maydis* (FB2), wie durch eine Gegenfärbung mit dem Vakuolenfarbstoff Cell tracker blue (rechts) gezeigt werden konnte. **C** Quantifizierung der Fluoreszenzintensität in den Vakuolen des Wildtyps und der Mutanten FB2 $\Delta sid2$  und FB2 $\Delta fer3$ . Die Fluoreszenzintensität war in der Mutante FB2 $\Delta sid2$  um 58 % reduziert, im FB2 $\Delta fer3$  Stamm um 69 %. (n: Anzahl der ausgewerteten Vakuolen; die Fehlerbalken repräsentieren den Standarderror).

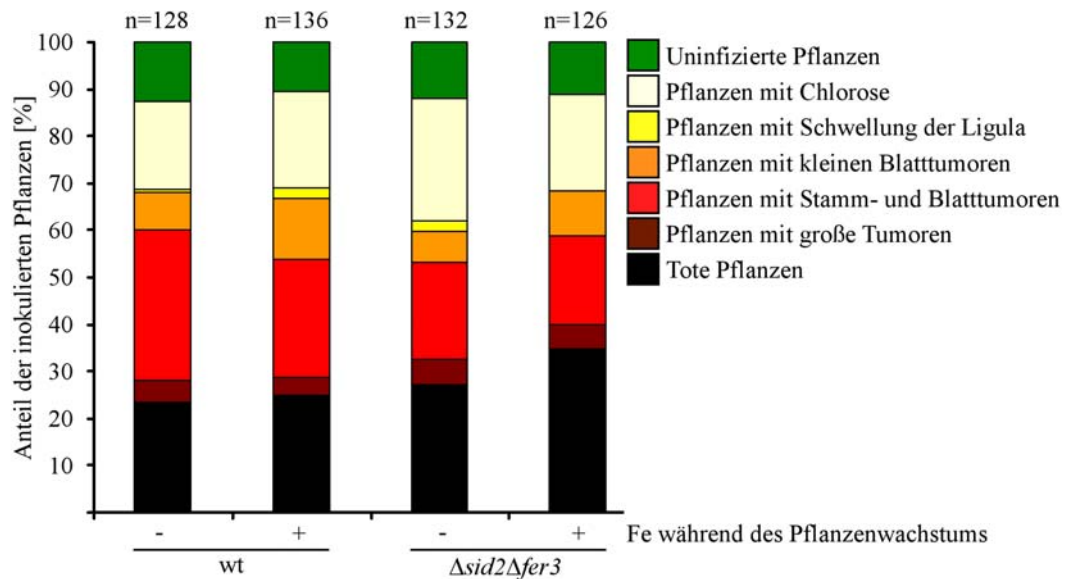
Für die Quantifizierung des freien Eisens in den Vakuolen der Mutanten FB2 $\Delta sid2$  und FB2 $\Delta fer3$  im Vergleich zum Wildtyp FB2 wurde die Fluoreszenzintensität des Calcein-AMs in den Vakuolen gemessen (Abbildung 19C). Eine Analyse von mindestens 36 Vakuolen ergab, dass die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in den Mutanten FB2 $\Delta sid2$  und FB2 $\Delta fer3$  um 58 % bzw. 69 % reduziert war im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 19C). In den Vakuolen beider Mutanten kommt es also zu einer Akkumulation von freiem Eisen. Beide Siderophore scheinen also eine Rolle für die Eisenspeicherung in Vakuolen zu spielen.

#### 2.3.4 Siderophore spielen keine Rolle für die Virulenz von *U. maydis*

Ein besonderes Interesse galt der Frage, ob den Siderophoren neben ihrer wichtigen Bedeutung während des Wachstums in axenischer Kultur und als Eisenspeicher eine Rolle für die Virulenz von *U. maydis* zukommt.

Es war bereits gezeigt worden, dass das Permease-basierte Eisenaufnahmesystem spielt eine entscheidende Rolle für die Virulenz von *U. maydis* spielt (Eichhorn *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu zeigten  $\Delta sid1$ -Deletionsmutanten keine Verringerung der Virulenz (Mei *et al.*, 1998). Um auszuschließen, dass die Aktivität der Ornithinmonooxygenase Sid1 *in planta* durch ein redundantes Enzym übernommen werden kann, wurden Pflanzeninfektionen mit kompatiblen Stämmen durchgeführt, in denen die Gene *sid2* und *fer3* deletiert waren. Im Genom von *U. maydis* finden sich neben Sid2 und Fer3 keine weiteren offenen Leserahmen, die für NRPS codieren könnten. Wie bei Infektionen mit  $\Delta sid1$ -Mutanten konnte auch im Fall der Doppelmutanten  $\Delta sid2\Delta fer3$  kein Einfluss auf die Virulenz festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob der Eisenhaushalt der Pflanze einen Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis* hat, wurden für ein weiteres Infektionsexperiment statt Erde Vermiculit für die Aussaat der verwendet. Das inerte Pflanzgranulat Vermiculit stellt den Pflanzen keinerlei Nährstoffe zur Verfügung, was eine Düngung mit definierten Nährlösungen ermöglicht. Die Pflanzen wurde entweder mit einer eisenfreien Nährlösung gegossen (-Fe) oder alle zwei Tage mit 17  $\mu\text{mol FeCl}_3$  (+Fe) behandelt. Sieben Tage nach der Aussaat wurden diese Pflanzen mit kompatiblen Wildtypstämmen bzw. mit kompatiblen  $\Delta sid2\Delta fer3$ -Deletionsstämmen inokuliert. Die vierzehn Tage nach der Infektion erfolgte Bonitur zeigte keinen Unterschied zwischen den einzelnen Infektionsansätzen (Abbildung 20). Sowohl der Wildtyp als auch die Doppeldeletionsmutanten  $\Delta sid2\Delta fer3$  führten bei ca. 70 % aller inokulierten Pflanzen zur Tumorinduktion oder zum Absterben (Abbildung 20). Die  $\Delta sid2\Delta fer3$ -Mutante induzierte in Pflanzen, die mit oder ohne Eisenversorgung angezogen wurden, vergleichbar starke Infektionssymptome (Abbildung 20). Ein Einfluss der Siderophore auf die Virulenz von *U. maydis* konnte somit nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 20: Siderophore spielen keine Rolle für die Virulenz von *U. maydis*.** Pflanzen wurden in Vermiculit ausgesät und mit einer eisenfreien (-) oder eisenhaltigen (+) Nährlösung gedüngt. Die Infektion mit kompatiblen Wildtypstämmen bzw. Deletionsstämmen  $\Delta sid2\Delta fer3$  erfolgte sieben Tage nach der Aussaat. Vierzehn Tage nach der Infektion zeigten ca. 70 % der Pflanzen, die mit den Wildtyp- bzw. mit den Mutantenstämmen  $\Delta sid2\Delta fer3$  infiziert wurden, sowohl unter Eisenmangel als auch bei Eisensupplementation Infektionssymptome.

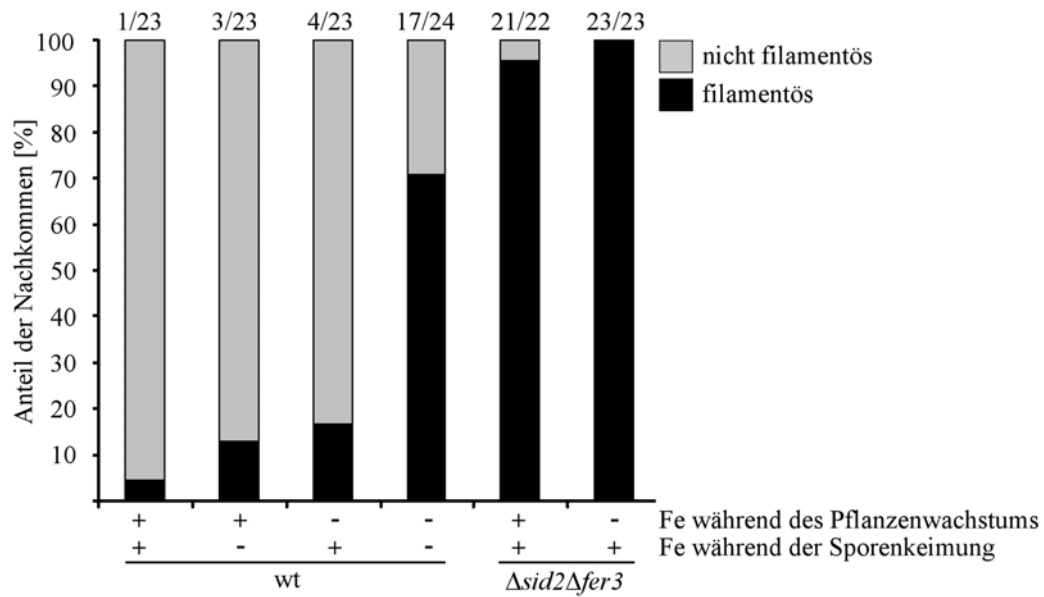
### 2.3.5 Siderophore sind essentiell für die Eisenspeicherung in Sporen von *U. maydis*

Bereits in meiner Diplomarbeit habe ich die Beobachtung gemacht, dass Sporen einer Kreuzung kompatibler Doppelmutanten  $\Delta sid2\Delta fer3$  während der Keimung nicht in der Lage waren, die Meiose vollständig zu vollführen und daher Nachkommen hervorbrachten, die filamentös auf Aktivkohle-haltigem Medium wuchsen. Analysen der Paarungstyploci ergaben, dass die isolierten Sporidien der  $\Delta sid2\Delta fer3$ -Mutante beide *a*- und beide *b*-Loci trugen und somit einen diploiden Chromosomensatz enthielten.

Um die Bedeutung von Eisen und seiner Speicherung während der Sporenbildung und -keimung genauer zu analysieren, wurden Sporen der Wildtyp- und der Mutanteninfektion  $\Delta sid2\Delta fer3$  aus den oben beschriebenen Infektionsexperimenten in Vermiculit gesammelt (Abbildung 20). Die Sporen aus der Infektion kompatibler Mutanten  $\Delta sid2\Delta fer3$  wurden auf Eisenvollmedium, und die Sporen der Wildtypinfektion auf Eisenvoll- und Eisenmangelmedium ausgekeimt (Abbildung 21). Für die Analyse des Meiosedefektes wurden durch Vereinzelung aus den gekeimten Sporen individuelle Nachkommen isoliert und anschließend

Einzelkolonien in Flüssigmedium angeimpft. Diese Flüssigkulturen wurden auf Aktivkohlehaltige-Platten getropft und nach zweitägiger Inkubation auf ihre Wachstumsmorphologie untersucht. Kulturen haploider Sporidien bilden glatte, glänzende Kolonien auf diesen Platten aus, während diploide Kulturen filamentöse, weiße Kolonien hervorbringen. Auch in diesem Experiment zeigten die Nachkommen der Infektion mit den Doppelmutanten  $\Delta sid2\Delta fer3$  einen klaren Meiosedefekt (Abbildung 21). Bei den Nachkommen der Mutanten  $\Delta sid2\Delta fer3$ , die aus eisensupplementierten Pflanzen isoliert wurden, zeigten 21 von 22 untersuchten Nachkommen filamentöses Wachstum auf Aktivkohle-haltigen Platten. Bei den Sporen aus Pflanzen, die mit einer eisenfreien Nährlösung gedüngt wurden, wuchsen alle 23 getesteten Nachkommen filamentös. Im Gegensatz dazu wuchsen nur 5 % der Nachkommen des Wildtyps (1 von 23) filamentös, wenn die Sporen aus eisensupplementierten Pflanzen isoliert wurden und die Sporenkeimung auf Eisenvollmedium stattfand. Ein Anstieg des Anteils der filamentösen Nachkommen auf 3 von 23 (13 %) war dann zu beobachten, wenn die Sporen des Wildtyps zur Keimung auf Eisenmangelmedium ausgestrichen wurden. Ein ähnlicher Anteil diploider Nachkommen (4 von 23, 17 %) wurde beobachtet, wenn die Sporen aus Eisenmangelpflanzen stammten und die Keimung auf Eisenvollmedium stattfand. Ihr Anteil erhöhte sich auf 71 % (17 von 24), wenn die Nachkommen der Wildtypkreuzung aus -Fe-Pflanze stammten und während der Keimung nicht mit Eisen supplementiert wurde (Abbildung 21).

Diese Untersuchungen machen deutlich, dass Siderophore eine zentrale Rolle für die Eisenspeicherung in den Sporen spielen. Deletionsmutanten, die keine Siderophore synthetisieren können, sind nicht in der Lage, die Meiose während der Keimung korrekt ablaufen zu lassen und generieren daher diploide, filamentöse Nachkommen. Der gleiche Phänotyp ist im Falle des Wildtyps zu beobachten, wenn dieser aufgrund von Eisenmangel während der Infektion und Sporenkeimung nicht genügend Eisen speichern oder aus der Umgebung rekrutieren kann



**Abbildung 21: Eisenmangel während der Sporenbildung und Keimung führt zu diploiden Nachkommen.** Es wurden Sporen aus einer Infektion mit kompatiblen Wildtyp- und Mutantenstämmen  $\Delta sid2\Delta fer3$  aus Pflanzen in Vermiculit isoliert. Diese Pflanzen wurden entweder mit Eisen-haltigem Dünger (+) oder Eisen-freiem Dünger (-) während des Wachstums gegossen. Die generierten Sporen von *U. maydis* wurden auf Eisenvollmedium (+) oder Eisenmangelmedium (-) ausgekeimt. Die Nachkommen dieser Sporen wurden auf Aktivkohleplatten ausgestrichen und auf filamentöses Wachstum untersucht. Über den Balken ist die Anzahl der filamentösen Nachkommen relativ zur Gesamtzahl der getesteten Nachkommen angegeben. Dieses Experiment wurde weitere Male mit Sporen einer unabhängigen Infektion durchgeführt und ergab ähnliche Resultate.

## 2.4 Regulation der Siderophorbiosynthese in *U. maydis*

Für die Siderophorbiosynthesegene von *U. maydis*, die in den zwei Clustern auf Chromosom I und II lokalisiert sind (Abbildung 3), konnte gezeigt werden, dass sie über den Transkriptionsfaktor Urbs1 eisenabhängig reguliert werden (Eichhorn *et al.*, 2006, Abschnitt 1.2). Dabei findet eine Repression der Gene statt, wenn genügend Eisen im Medium vorhanden ist und Urbs1 in seiner aktiven eisengebundenen Form vorliegt. Bei Eisenmangel wirkt Urbs1 nicht mehr länger als Repressor, und die Transkription der Gene *sid1*, *sid2*, *fer3*, *fer4*, *fer5* und *fer8* findet statt, was die Synthese von Ferrichrom und Ferrichrom A zur Folge hat.

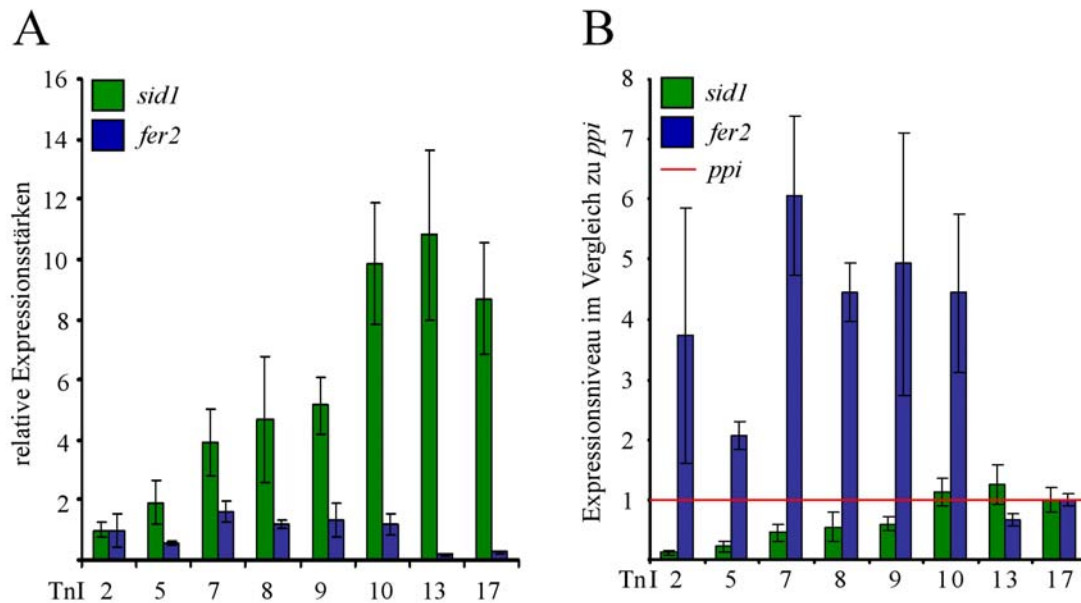
Maispflanzen stellen für *U. maydis* eine Eisenmangelumgebung dar, da Deletionsmutanten im Permease-basierten System eine verringerte Virulenz aufweisen (Eichhorn *et al.*, 2006). Einzeldelationen der Permease Fer2 und der Oxidoreduktase Fer1, die beide ebenfalls in einem der Urbs1-regulierten Cluster lokalisiert sind, führen zu einer Verringerung der Tumorraten um mehr als 50 % im Vergleich zum Wildtyp. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass im Wildtyp die Gene *fer1* und *fer2* exprimiert werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Urbs1 während der Infektion inaktiv ist und die Gene der Urbs1-regulierten Cluster transkribiert werden. Im Gegensatz zum Permease-basierten System scheinen die Siderophore jedoch keinen Einfluss auf die Virulenz zu haben (Abschnitt 2.3.4). Erst während der Sporenreifung sind sie essentiell für die Speicherung von Eisen, um den Ablauf der Meiose zu gewährleisten (Abschnitt 2.3.5). Diese Ergebnisse deuten an, dass die Siderophore erst zu einem späten Zeitpunkt der Infektion gebildet werden. Eine Repression der Siderophorbiosynthese in den frühen Stadien der pathogenen Entwicklung könnte für *U. maydis* vorteilhaft sein, da bereits für *Erwinia chrysanthemi* gezeigt werden konnte, dass Siderophore als Elicitoren der Pflanzenabwehr agieren können (Dellagi *et al.*, 2005, Abschnitt 1.4). Es stellte sich daher die Frage, ob die Siderophorbiosynthesegene zum Beginn der Infektion Urbs1-unabhängig reprimiert werden und welcher Transkriptionsfaktor diese Aufgabe übernehmen könnte.



### 2.4.1 Die Expression von *sid1*, jedoch nicht von *fer2*, ist während der frühen Infektionsphase reprimiert

Um zu untersuchen, ob die Siderophorbiosynthese während der frühen Infektionsphase induziert wird, wurden quantitative RT-PCR-Experimente für die Expression des Schlüsselenzyms Sid1 durchgeführt. Ferner wurde die Expression von Fer2 als Komponente des Permease-basierten Systems untersucht (Abbildung 22). Für diese Analysen wurden Maispflanzen, die in Erde ausgesät wurden, mit einer Mischung der kompatiblen Wildtypstämme FB1 und FB2 infiziert. An den Tagen 2, 5, 7, 8, 9, 10, 13 und 17 nach der Infektion wurde RNA aus den infizierten Pflanzengeweben isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA stellte ein Gemisch aus pilzlicher und pflanzlicher cDNA dar. Aus diesem Grund war es unerlässlich, die Menge der *fer2*- und *sid1*-Transkripte ins Verhältnis zu einem sogenannten „house-keeping“-Gen von *U. maydis* zu setzen. Als Kontrollgen wurde *ppi* von *U. maydis* gewählt, das konstitutiv exprimiert wird (Schirawski *et al.*, 2005).

Die Expression von *sid1* stieg im Verlauf der Infektion stetig an, was sich in einer großen Änderung der relativen Expressionsstärke bezogen auf die Expression an Tag 2 äußerte (Abbildung 22A). An den Tagen 10, 13 und 17 nach der Infektion war die relative Expressionsstärke 10fach höher als an Tag 2 (Abbildung 22A). Im Gegensatz dazu erfuhr die Expression von *fer2* nur eine geringe faktorielle Veränderung während der frühen Infektionsphasen. Erst an den Tagen 13 und 17 nach der Infektion, fiel das Expressionsniveau auf 1/5 verglichen zur Expression am Tag 2 ab (Abbildung 22A). Das Expressionsniveau von *fer2* entsprach zu diesem Zeitpunkt der Expression von *ppi*, während zum Beginn der Infektion die Expression von *fer2* etwa 4fach stärker war als *ppi* (Abbildung 22B). Das Expressionsniveau von *sid1* hingegen war bis zum Tag 9 geringer als *ppi* und stieg im Verlauf der Infektion auf ein zu *ppi* vergleichbares Niveau an (Abbildung 22B). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass *fer2* während der frühen Infektion gleichbleibend sehr stark exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu war die Expression von *sid1* relativ geringer, steigt aber im Verlauf der Infektion stark an. Dies ließ auf eine differentielle Urbs1-unabhängige Regulation der beiden hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme schließen. Die Expression von *sid1* erreichte ein Maximum zu einem Zeitpunkt, an dem die Reifung der Sporen stattfindet und an dem den Siderophoren eine wichtige Bedeutung zukommt (siehe Abschnitt 2.3.5).



**Abbildung 22: Die hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme werden differentiell reguliert.** **A.** qRT-PCR-Analysen der Expression von *sid1* und *fer2* im Vergleich zur Expression des „house-keeping“-Gens *ppi* zeigten, dass die Expression von *sid1* großen Veränderungen der relativen Expressionsstärke im Verlauf der Infektion bezogen auf Tag 2 unterlag. Ab Tag 10 nach der Infektion war die mRNA-Menge von *sid1* etwa 10fach höher als 2 Tage nach der Infektion. Im Gegensatz dazu zeigte *fer2* während des gesamten Infektionsverlaufes nur eine geringe faktorielle Expressionsänderung. **B.** Zu Beginn der Infektion war die Expression von *sid1* relativ schwach und stieg im Verlauf der Infektion immer weiter an, um am Tag 17 nach der Infektion das gleiche Niveau wie *ppi* zu erreichen. Die Expression von *fer2* war zunächst höher als die Expression von *ppi* und erreichte an Tag 17 die gleiche Höhe wie die Expression von *sid1* und *ppi*. Abgebildet ist der Durchschnitt aus drei technischen Replikaten. Das Experiment wurde mit Material einer unabhängigen Pflanzeninfektion wiederholt und zeigte ähnliche Resultate. (TnI: Tage nach der Infektion, relative Expressionsstärken: faktorielle Expressionsänderungen von *sid1* und *fer2* im Vergleich zur *ppi*-Expression bezogen auf Tag 2 nach der Infektion).

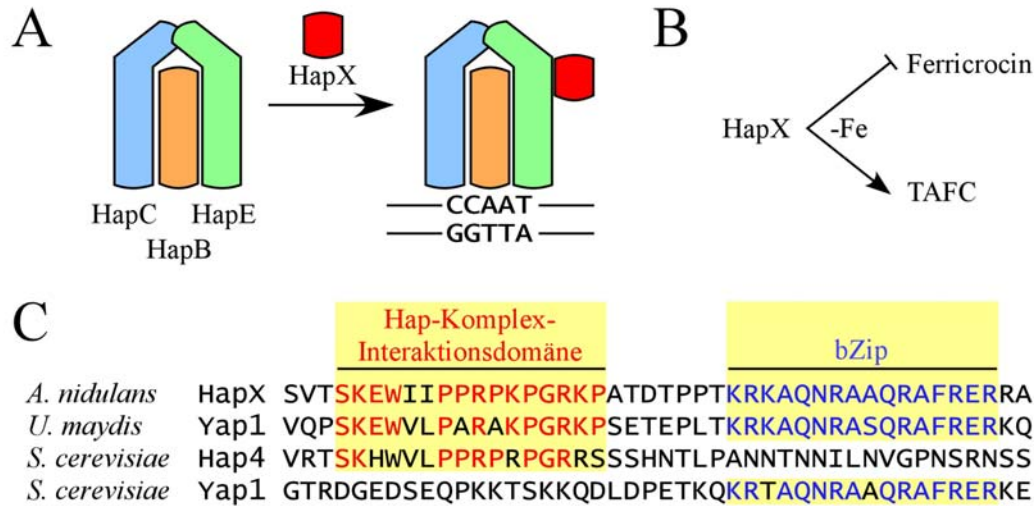
#### 2.4.2 Yap1 ist ein möglicher Repressor der Siderophorbiosynthese

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression des Siderophorbiosynthesegens *sid1* zu frühen Zeitpunkten der Infektion sehr gering ist, sollte der dafür verantwortliche Transkriptionsfaktor identifiziert werden. Einen Hinweis auf diesen Transkriptionsfaktor lieferten Erkenntnisse aus *A. nidulans*. In *A. nidulans* wird bei Eisenmangelbedingungen die Synthese der Siderophore Triacetylfusarinin C (TAFC) und Ferricrocin induziert (Eisendle *et al.*, 2003), während die Expression von Proteinen, die Eisen als Co-Faktor enthalten oder am Eisenmetabolismus beteiligt

sind, reprimiert wird (Haas *et al.*, 1999, Oberegger *et al.*, 2001, 2002a). Diese differentielle Regulation erfolgt durch den Transkriptionsfaktor SreA (Oberegger *et al.*, 2001). SreA gehört wie Urbs1 zu den GATA-Transkriptionsfaktoren. In *A. nidulans* wird die Synthese der Siderophore neben SreA auch noch durch den Transkriptionsfaktor HapX reguliert (Hortschansky *et al.*, 2007, Abbildung 23B). In  $\Delta hapX$ -Deletionsmutanten von *A. nidulans* sinkt die Konzentration an TAFC unter Eisenmangelbedingungen im Vergleich zum Wildtyp. Gleichzeitig steigt der Ferricrocin-Spiegel an. Die Synthese des Eisenspeicher-Siderophors Ferricrocin wird also bei Eisenmangel im Wildtyp durch HapX reprimiert. Diese Regulation durch HapX wird über den sogenannten Hap-Komplex vermittelt (Abbildung 23A). Der Hap-Komplex besteht in *A. nidulans* aus der Grundeinheit der drei Proteine HapB, HapC und HapE. Durch Bindung weiterer Proteine an diesen Grundkomplex wird die Regulation verschiedenster Zielgene gesteuert. Dazu bindet der Hap-Komplex an die Promotoren der zu regulierenden Gene. Dabei wird die DNA-Konsensussequenz CCAAT erkannt (Mantovani, 1998). Bindet HapX bei Eisenmangel an den Hap-Komplex, so findet eine Repression der Ferricrocin-Biosynthese statt, da kein Eisenspeicher benötigt wird. Für die Interaktion mit dem Hap-Komplex besitzt HapX eine Hap-Komplex-Interaktionsdomäne, die aus 17 Aminosäuren besteht (Abbildung 23C).

Um mögliche Kandidatenproteine aus *U. maydis* zu identifizieren, die die Siderophorbiosynthese unabhängig von Urbs1 während der Infektion reprimieren könnten, wurde nach diesem 17-Aminosäuremotiv im Genom von *U. maydis* gesucht (Abbildung 23C). Yap1 ist das einzige Protein, das diese Hap-Komplex-Interaktionsdomäne enthält. Yap1 ist an der  $H_2O_2$ -Stressantwort von *U. maydis* beteiligt (Molina und Kahmann, 2007). Die Regulation findet über die Bindung der bZIP-Domäne an die Promotoren der beeinflussten Gene statt. In *S. cerevisiae* hingegen finden sich zwei Proteine mit jeweils einer der beiden Domänen. Yap1 aus Hefe besitzt die bZIP-Domäne und ist ebenfalls an der  $H_2O_2$ -Stressregulation beteiligt (Moye-Rowley *et al.*, 1989). Hap4 besitzt die Hap-Komplex-Interaktionsdomäne, ist aber nicht in die Regulation der Eisenaufnahmesysteme in *S. cerevisiae* involviert. Vielmehr vermittelt Hap4 die Anpassung des Metabolismus von fermentierbaren zu nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Pinkham und Guarente, 1985). *U. maydis* Yap1 kann die Funktion von Hap4 nicht ersetzen, wie durch die Komplementation

einer *S. cerevisiae*  $\Delta hap4$ -Mutante gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu kann Yap1 aus *U. maydis* die Funktion des *S. cerevisiae* Proteins Yap1 übernehmen (Molina und Kahmann, 2007).



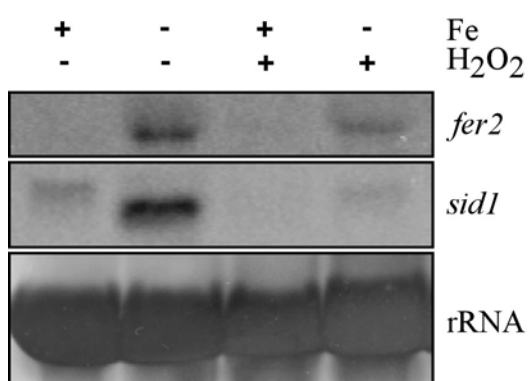
**Abbildung 23: Yap1 besitzt die Hap-Komplex-Interaktionsdomäne zur Bindung an den Hap-Komplex.** **A.** In *A. nidulans* besteht der Hap-Komplex aus den Grundeinheiten HapB, HapC und HapE. An diesen Komplex kann HapX mittels der Hap-Komplex-Interaktionsdomäne binden. Der Proteinkomplex bindet an die DNA-Konsensussequenz CCAAT (Abbildung verändert nach Brakhage *et al.*, 1999). **B.** HapX ermöglicht eine differenzielle Regulation der beiden Siderophore von *A. nidulans*. Unter Eisenmangelbedingungen wird die Synthese des Eisenspeichersiderophors Ferricrocin reprimiert, während die Generierung von Triacetylfusarinin C (TAFC) induziert wird, das für die Rekrutierung von Eisen verantwortlich ist (Abbildung modifiziert nach Haas *et al.*, 2008). **C.** Im Genom von *U. maydis* findet sich nur das Protein Yap1, das die Hap-Komplex-Interaktionsdomäne enthält. Außerdem enthält Yap1 eine bZip-Domäne zur direkten Bindung an DNA bei  $H_2O_2$ -Stress. Auch in HapX findet sich neben der Hap-Komplex-Interaktionsdomäne dieser bZip. In *S. cerevisiae* hingegen scheinen die beiden Funktionen – Regulation durch Bindung an den Hap-Komplex und direkte DNA-Bindung durch den bZip – auf zwei Proteine aufgeteilt.

Für die eisenabhängige Regulation ist HapX in der Lage Fe(III) zu binden (Hortschansky *et al.*, 2007). Unter diesen Bedingungen verliert HapX seine Affinität zum Hap-Komplex und die Expression der Ferricrocin-Biosynthesegene findet statt. Aber auch HapX selbst unterliegt einer eisenabhängigen Regulation. So wird in *A. nidulans* die Expression von HapX eisenabhängig durch SreA reguliert (Oberegger *et al.*, 2002b). Für *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *yap1* durch Urbs1 bei hohen Eisenkonzentrationen reprimiert wird (Eichhorn *et al.*, 2006). In  $\Delta hapX$ -Deletionsmutanten von *A. nidulans* kommt es zur Akkumulation der Häm-Vorstufe Prototporphyrin IX, die zu einer Rotfärbung der Zellen führt. Auch aus den

Zellen der  $\Delta yap1$ -Mutanten von *U. maydis* konnte ein roter Farbstoff isoliert werden (L. Molina, pers. Mitteilung). Diese Ähnlichkeit zwischen HapX von *A. nidulans* und Yap1 von *U. maydis* legen die Vermutung nahe, dass Yap1 an der Repression der Siderophorbiosynthese während der frühen Infektionsphasen von *U. maydis* beteiligt sein könnte.

#### 2.4.3 Die Expression von *sid1*, nicht aber von *fer2*, wird durch $H_2O_2$ reprimiert

Nachdem Yap1 ein möglicher Kandidat für die Inhibition der Siderophorbiosynthese während der frühen Infektionsphase sein könnte, sollte nun der Einfluss von  $H_2O_2$  auf die Transkription von *sid1* untersucht werden. Für diesen Versuch wurde der Stamm FB2 in Eisenmangel- (-Fe) und Eisenvollmedium (+Fe) bis zu einer optischen Dichte von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen aufgeteilt und die Hälfte der Kulturen mit 5 mM Wasserstoffperoxid versetzt ( $+H_2O_2$ ). Die andere Hälfte der Kulturen blieb unbehandelt ( $-H_2O_2$ ). Aus diesen vier Kulturen wurde RNA isoliert und die Expression der Gene *sid1* und *fer2* mittels Northern Blot analysiert (Abbildung 24). Die Expression von *sid1* und *fer2* wurde durch die Zugabe von Eisen (+Fe) reprimiert. Unter Eisenmangel (-Fe) wurde die Expression beider Gene stark induziert. Die Zugabe von  $H_2O_2$  führt zu einer Repression von *sid1* selbst unter Eisenmangelbedingungen, während die Expression von *fer2* nahezu unbeeinflusst blieb (Abbildung 24). Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass durch  $H_2O_2$  nur das Siderophor-basierte Eisenaufnahmesystem beeinflusst wird. Dies unterstützt die Hypothese, dass Yap1 neben Urbs1 auf die Siderophorbiosynthese Einfluss nimmt



**Abbildung 24: Die Expression von *sid1* wird durch  $H_2O_2$  reprimiert.** Die Expression von *fer2* und *sid1* wurde in Eisenvollmedium reprimiert (+Fe) und unter Eisenmangel induziert (-Fe). Zugabe von  $H_2O_2$  unter Eisenmangelbedingungen führte zur Repression von *sid1*, während *fer2* nahezu unbeeinflusst blieb. Es wurden 10  $\mu$ g Gesamt-RNA pro Spur geladen. Als Ladekontrolle diente die Methylenblaufärbung der rRNA.



## 3. Diskussion

### 3.1 Siderophorbiosynthese

Im Rahmen meiner Arbeit ist es mir gelungen, die Siderophorbiosynthesewege in *U. maydis* aufzuklären. Ich konnte sechs neue Enzyme, Fer4, Fer5, Fer8, Hcs1, Act1 und Act2, identifizieren, die an der Synthese der Siderophore von *U. maydis* beteiligt sind. Basierend auf der Annotation dieser Enzyme konnten putative Biosynthesewege für Ferrichrom und Ferrichrom A postuliert werden (Abbildung 25). Die zwei redundanten Acetyltransferasen Act1 und Act2 sind an der Acetylierung von Hydroxyornithin während der Synthese von Ferrichrom beteiligt. Diese enzymatische Reaktion stellte den letzten bisher uncharakterisierten Schritt in der Ferrichrom-Biosynthese dar. Act1 und Act2 scheinen aber nicht die einzigen Enzyme zu sein, die die Acetylierung von Hydroxyornithin katalysieren können, da die Doppelmutante FB2 $\Delta act1\Delta act2$  weiterhin in der Lage ist, kleine Mengen an Ferrichrom zu bilden (Abbildung 14). Dies lässt darauf schließen, dass eine dritte redundante Acetyltransferase an der Ferrichrom-Biosynthese beteiligt ist. Ein möglicher Kandidat für dieses Enzym ist Act3, da Kulturüberstände der FB2 $\Delta act3$ -Mutante einen leicht erhöhten relativen Eisengehalt aufweisen (Abbildung 14A). Interessanterweise wird die Expression von *act3* durch Eisen (2,5 fach) und durch Urbs1 (3 fach) reprimiert (Eichhorn *et al.*, 2006). Es ist also möglich, dass die drei Acetyltransferasen Act1, Act2 und Act3 gemeinsam an der Ferrichrom-Biosynthese beteiligt sind. Ob diese drei redundanten Enzyme die einzigen Acetyltransferasen der Ferrichrom-Biosynthese darstellen, könnte die Analyse der Siderophore einer Trippelmutante  $\Delta act1\Delta act2\Delta act3$  klären.

Im Gegensatz zu *act3* wird die Expression von *act1* und *act2* nicht über Eisen und Urbs1 reguliert (Eichhorn *et al.*, 2006). Dies deutet darauf hin, dass Act1 und Act2 neben der Acetylierung von Hydroxyornithin zur Generierung von Ferrichrom noch andere Substrate verwenden könnten. Es ist z. B. unbekannt, ob Act1 und Act2 spezifisch für Hydroxyornithin sind, oder ob sie auch Ornithin als Substrat acetylieren können. Acetylornithin könnte dann in einem zweiten Schritt durch Sid1 zu Acetylhydroxyornithin hydroxyliert werden, vorausgesetzt, dass Sid1 sowohl Ornithin als auch Acetylornithin als Substrat verwenden kann. Die reversible Acetylierung von

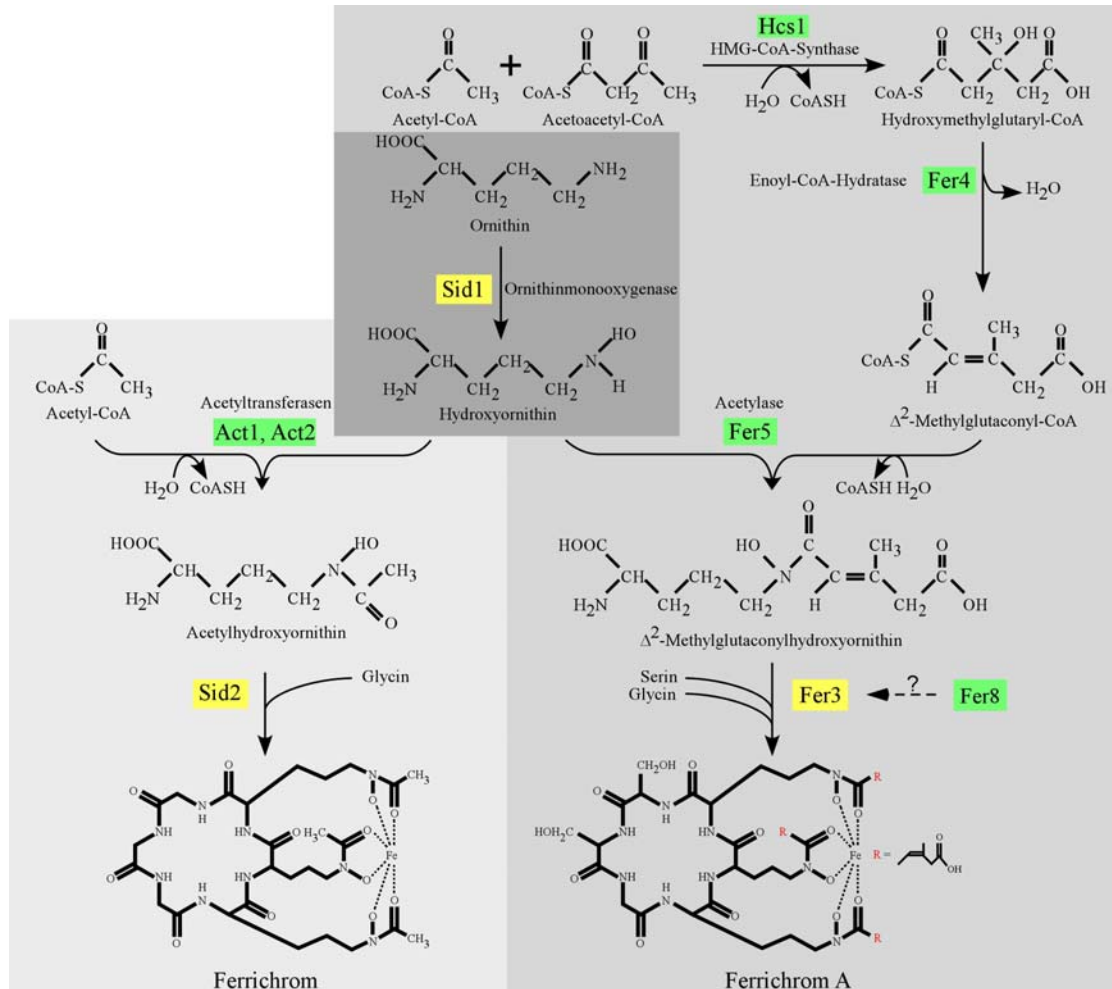
Ornithin zu Acetylornithin findet im Rahmen des Aminosäurestoffwechsels statt. Daher liegen sowohl Ornithin als auch Acetylornithin in der Zelle vor. Dennoch scheint es aus folgenden Gründen wahrscheinlicher, dass Sid1 eine Substratspezifität für Ornithin aufweist. Erstens wird Hydroxyornithin auch für die Synthese von Ferrichrom A benötigt. Eine Acetylierung von Ornithin, gefolgt von der Hydroxylierung zu Acetylhydroxyornithin durch Sid1, würde eine Deacetylierung notwendig machen, um die Ferrichrom A-Biosynthese zu ermöglichen. Zweitens führt die Hydroxylierung der Aminogruppe von Ornithin zu einer Erhöhung der Reaktivität des Stickstoffs dieser Gruppe, der im Folgenden leichter acetyliert werden kann. Drittens finden sich keine Homologe zu *act1*, *act2* und *act3* in *S. cerevisiae* (Tabelle 1). Hefe synthetisiert keine eigenen Siderophore, verfügt aber über die Enzyme des Aminosäuremetabolismus. Des Weiteren finden sich Homologe in den Pilzen *A. fumigatus*, *A. nidulans* und *S. pombe*, die Siderophore produzieren. Daher ist es wahrscheinlich, dass die identifizierten Acetyltransferasen spezifisch für die Ferrichrom-Biosynthese sind und Hydroxyornithin als Substrat verwenden. Um die Reihenfolge der katalytischen Schritte experimentell untersuchen zu können, sind *in vitro*-Versuche notwendig, bei denen die Enzyme Sid1, Act1 und Act2 aufgereinigt und auf ihre Substratspezifität getestet werden können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HMG-CoA-Synthase Hcs1 eine entscheidende Rolle bei der Synthese von Zellwandbestandteilen spielt, da die Mutante FB2 $\Delta$ *sid2pcrg1::hcs1* unter reprimierenden Bedingungen einen Zellseparierungsdefekt aufweist (Abbildung 10). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass HMG-CoA einen Vorläufer der Ferrichrom A-Biosynthese darstellt. Die Repression der HMG-CoA-Synthase Hcs1 führte zu einer Verringerung der Ferrichrom A-Generierung (Abbildung 12).

Neben Hcs1 konnten drei weitere Enzyme identifiziert werden, die an der Synthese von Ferrichrom A beteiligt sind. Deletionsmutanten von *fer4*, *fer5* und *fer8* sind nicht in der Lage Ferrichrom A herzustellen (Abbildung 6). Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse konnte ein Syntheseweg für Ferrichrom A postuliert werden (Abbildung 25). Es wird angenommen, dass Hcs1 HMG-CoA synthetisiert, das von der Enoyl-CoA-Hydratase Fer4 zu  $\Delta^2$ -Methylglutaconyl-CoA (MG-CoA) convertiert wird. MG-CoA wird anschließend unter Abspaltung von CoA auf Hydroxyornithin durch die



Acylase Fer5 übertragen. Dadurch entsteht  $\Delta^2$ -MG-Hydroxyornithin. Drei dieser Vorläufer werden von der NRPS Fer3 für die Zyklisierung mit Serin und Glycin verwendet, wodurch Ferrichrom A entsteht.



**Abbildung 25: Biosynthesewege von Ferrichrom und Ferrichrom A in *U. maydis*.** Die Enzyme, die bereits bekannt waren, sind Gelb unterlegt. Alle grün unterlegten Enzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit identifiziert (Details siehe Text).

Wie Fer3 besitzt auch Sid2 nur drei funktionale Module, die wiederholt verwendet werden müssen, um den Einbau von sechs Aminosäuren in Ferrichrom A und Ferrichrom zu ermöglichen. Es wird postuliert, dass die A-Domäne 1 von Sid2 (Abbildung 2) für den Einbau von drei Glycin-Resten verantwortlich ist, während die A-Domänen 2 und 3 beide Acetylhydroxyornithin in Ferrichrom einbauen (Schwecke *et al.*, 2006). In Fer3 werden die beiden Serinreste wahrscheinlich durch die A-Domäne 1, das Glycin durch die A-Domäne 2 und die drei  $\Delta^2$ -MG-Hydroxyornithinreste durch die A-Domäne 3 erkannt (Schwecke *et al.*, 2006). Die

Bestimmung der Substratspezifität der einzelnen Domänen beruht dabei allein auf Aminosäuresequenz-Analysen der NRPS. A-Domänen besitzen einen sogenannten nicht-ribosomalen Code, der Aufschluss über die Aminosäure geben kann, die von der Bindetasche der A-Domäne erkannt wird (Stachelhaus *et al.*, 1999, Challis *et al.*, 2000a, b). Eine Aufreinigung der Domänen von Sid2 und Fer3 zur Analyse der verwendeten Aminosäuren könnte die postulierte Substratverwendung belegen.

Die mehrfache Verwendung der Module stellt eine besondere Herausforderung dar. Möglicherweise setzt sie die Modifikation der NRPS-Struktur durch andere Enzyme voraus, um die Benutzung der einzelnen Module zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt zu gewährleisten. Ein mögliches Enzym, das eine solche Modifikation von Fer3 vornehmen könnte, ist Fer8. Deletionsmutanten von *fer8* synthetisieren kein Ferrichrom A (Abbildung 6), was darauf schließen lässt, dass Fer8 direkt an der Siderophor-Biosynthese beteiligt ist. Bisher konnte Fer8 aber noch keine enzymatische Reaktion zugeordnet werden. Fer8 enthält eine FAD-abhängige Pyridinnukleotid-Oxidoreduktase-Domäne (IPR013027). Auf Grund dieser Domäne scheint es möglich, dass Fer8 Disulphidbrücken in Fer3 einbringen könnte, um eine korrekte Faltung und wiederholte Domänennutzung von Fer3 zu garantieren. Auch Sid2 enthält nicht genügend funktionale Module, um den linearen Einbau der sechs Aminosäuren in Ferrichrom zu ermöglichen. Daher scheint es wahrscheinlich, dass Sid2 ebenfalls durch Disulphidbrücken modifiziert werden muss. Im Genom von *U. maydis* finden sich zwei Homologe zu Fer8 (um00813 und um05689), die ebenfalls eine FAD-abhängige Pyridinnukleotid-Oxidoreduktase-Domäne enthalten. Wie Fer8 werden auch die Gene um00813 und um05789 über Urbs1 Eisen-abhängig reguliert (Eichhorn *et al.*, 2006). Untersuchungen von Kulturüberständen der Deletionsmutante FB2Δum05689 zeigten, dass dieser Stamm noch in der Lage war, Ferrichrom zu synthetisieren (Daten nicht gezeigt). Dies kann auf eine mögliche Redundanz der Proteine um05689 und um00813 zurückgeführt werden. Daher ist es sinnvoll, eine Doppelmutante FB2Δum05689Δum00813 herzustellen und auf ihre Fähigkeit zur Ferrichrom-Generierung zu testen. Dadurch könnte gezeigt werden, ob diese Enzyme an der Synthese von Ferrichrom beteiligt sind.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass Sid2 und Fer3 auf eine Modifikation durch Fer8 bzw. durch Fer8-Homologe angewiesen sind, könnten Fer3 und Fer8 sowie Sid2, um05689 und um00813 aufgereinigt und biochemisch analysiert werden. Sollten Sid2 und Fer3 tatsächlich auf Hilfsenzyme zur korrekten Faltung und Aktivierung

angewiesen sein, so würde erst die Expression der NRPS in Anwesenheit dieser Hilfsproteine zu funktionalen Enzymen führen. Die Überexpression und Aufreinigung von pilzlichen NRPS oder von NRPS-Domänen hat sich bisher als sehr schwierig erwiesen (von Döhren, 2004). Dies könnte möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass die NRPS nicht in Anwesenheit eines Fer8-Homologs aufgereinigt wurden.

### 3.2 Identifikation von Siderophortransportern

Im Rahmen dieser Arbeit ist es mir gelungen, Siderophortransporter von *U. maydis* zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden die fünf Kandidatengene *fer6*, *fer7*, *cim1*, *cim2* und *cim3* in dem Hefestamm  $\Delta fet3 \Delta arn1-4$  exprimiert, der nicht unter Eisenmangelbedingungen wachsen kann, da ihm sowohl die Eisenoxidase Fet3 als auch alle Siderophorimporter fehlen. Die Expression von *fer6* und *cim1* ermöglichte Wachstum auf Ferrichrom- und Ferrichrom A-haltigen Agarplatten (Abbildung 15), was darauf schließen lässt, dass beide Gene für Siderophorimporter codieren. Dabei zeigte Fer6 eine Präferenz für Ferrichrom A, während Cim1 bevorzugt Ferrichrom zu transportieren scheint. Neben der Aktivität als Siderophorimporter, zeigt Fer6 auch Siderophorexporteigenschaften (Abbildung 16). Somit stellt Fer6 den ersten charakterisierten pilzlichen Siderophorexporter dar. Der zugrunde liegende Mechanismus des Siderophortransportes ist dabei ungeklärt. Es ist nicht bekannt, unter welchen Umständen Fer6 die Siderophore importiert, und wann Fer6 Exportaktivität aufweist. Fer6 gehört zur Gruppe der sogenannten ABC-Transporter, die ATP-abhängig ihre Substrate transportieren. Bei allen bisher charakterisierten eukaryotischen ABC-Transportern handelt es sich um Exporter. Der Export der Siderophore durch Fer6 wird also wahrscheinlich durch die Hydrolyse von ATP ermöglicht. Wie Fer6 bei der Expression in Hefe als Siderophorimporter fungieren kann, ist unklar. Diese Frage liefert Spielraum für weitere Experimente. So könnte man z. B. versuchen, Fer6 aufzureinigen und in artifiziellen Membranen die Richtung des Siderophortransportes unter verschiedenen Siderophor- und ATP-Konzentration zu untersuchen. Um unterschiedliche Lokalisationen der Siderophortransporter zu visualisieren, könnten Fer6-GFP- und Cim1-GFP-Proteinfusionen hergestellt und die Fusionsprotein-tragenden Stämme mikroskopisch analysiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme keinen Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis* hat (Mei *et al.*, 1993, Abbildung 20). Andererseits spielen die Siderophore eine entscheidende Rolle für die Eisenspeicherung während der Sporenreifung (Abbildung 21). Dabei ist nicht bekannt, ob während dieser späten Infektionsphase die Siderophore sekretiert und wieder aufgenommen werden, was eine Aktivität von Fer6 und Cim1 voraussetzen würde, oder lediglich in der Zelle akkumulieren, um freies Eisen speichern zu können. Bei Verbleiben der Siderophore innerhalb der Zelle wäre es denkbar, dass *U. maydis* neben der Eisenaufnahme durch das Permease-basierte System auch in der Lage ist, sogenannte Phytosiderophore aufzunehmen, um seinen Eisenbedarf zu decken. Mais synthetisiert das Phytosiderophor 2'-Desoxymugeininsäure (DMA) (Mori und Nishizawa, 1987). Für Reispflanzen konnte gezeigt werden, dass durch DMA chelatiertes Eisen über die Wurzeln aufgenommen wird und anschließend in die Blätter transportiert wird (N. Nishizawa, pers. Mitteilung), wo Eisen für die Photosynthese benötigt wird. Zum Zeitpunkt der Samenreifung kommt es zu einer Translokation des DMAs von den Blättern in die reifenden Reiskörner. In ihnen wird Eisen gespeichert, um es den Keimlingen zur Verfügung zu stellen. Eisen wird also aus einem sogenannten „source tissue“ in ein „sink tissue“ verlagert. Auch in Maissamen kommt es zu einer starken Anreicherung von Eisen in den äußeren Bereichen des Scutellums und im Aleuron (Jacobs und Walker, 1977). Bisher gibt es aber keine Erkenntnisse über den Vorgang der Translokation in die Samen. Die Tumore von *U. maydis* in Maispflanzen stellen ebenso wie die Samen ein „sink tissue“ dar. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Frage, ob *U. maydis* die Verlagerung von DMA-gebundenem Eisen in das Tumorgewebe induziert, oder ob die Pflanze als Abwehrreaktion mit einem Entzug des DMAs reagiert. Um dies zu analysieren, könnte der Eisengehalt in den Wurzeln, Blättern, Samen und Tumoren infizierter Pflanzen durch die sogenannte Prussian Blue Färbung sichtbar gemacht werden und mit uninfizierten Pflanzen verglichen werden. Sollte diese Färbemethode Resultate mit zu geringer Auflösung erbringen, so könnte das in der Pflanze vorhandene Eisen auch durch die als PIXE (particle induced X-Ray emission spectrometry) bezeichnete Methode sichtbar gemacht werden. Bei dieser Methode werden Pflanzengewebe mit Protonen bombardiert. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung der Elektronen in den einzelnen Atomen. Jedes Atom kehrt

anschließend in seinen Ursprungszustand zurück und setzt dabei Strahlung frei, die charakteristisch für jedes Element ist. Dadurch lässt sich die Verteilung und Konzentration einzelner Elemente, u. a. Eisen, sehr genau bestimmen. Diese Methode hat z. B. bei der Lokalisation von Eisen in den Samen von *Lotus japonicus* Anwendung gefunden (C. Cvitanich, pers. Mitteilung). Es ist außerdem möglich, die Translokation von DMA-gebundenem radioaktiv markiertem Eisen in Echtzeit zu verfolgen. Dies ist erstmals sehr eindrucksvoll mit Reispflanzen gelungen (N. Nizhizawa, pers. Mitteilung). Durch die Anwendung der oben aufgeführten Methoden könnte es möglich sein, einen tieferen Einblick in den Einfluss von *U. maydis* auf den Eisenhaushalt seiner Wirtspflanze Mais zu gewinnen. Nach meiner Kenntnis ist bisher ein solcher Zusammenhang in einer Pathogen-Pflanze-Interaktion noch nicht untersucht worden.

Um zu überprüfen, ob *U. maydis* in der Lage ist, seinen Eisenbedarf durch die Aufnahme des Phytosiderophores DMA zu decken, wurde im Genom von *U. maydis* nach Homologen des *Zea mays* DMA-Transporters Ys1 (Curie *et al.*, 2001, Roberts *et al.*, 2004) gesucht. Es finden sich zwei *ys1*-Homologe, um02744 und um02763, die eine Aminosäureidentität von 23 % bzw. 21 % zu YS1 aufweisen. Eine Analyse kompatibler Doppeldeletionsmutanten  $\Delta$ um02744 $\Delta$ um02763 in Pathogenitätsstudien zeigte jedoch, dass diese Mutanten ebenso virulent wie der Wildtyp waren (Daten nicht gezeigt). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aufnahme von DMA für die Virulenz von *U. maydis* von Bedeutung ist. Um dies zu klären, ist es sinnvoll Pathogenitätsstudien mit  $\Delta$ fer2 $\Delta$ um02744 $\Delta$ um02763-Trippeldeletionsmutanten durchzuführen. Infektionen mit kompatiblen Stämmen der Deletionsmutanten  $\Delta$ fer2 zeigen zwar eine deutliche Reduktion der Virulenz, sind aber nicht apathogen (Eichhorn *et al.*, 2006). Dies könnte möglicherweise auf eine Versorgung mit Eisen durch die Aufnahme von DMA während der biotrophen Entwicklung zurückgeführt werden. Sollte die Eisenakquirierung mittels DMA wichtig für die Virulenz von *U. maydis* sein, sollten kompatible Trippeldeletionsmutanten  $\Delta$ fer2 $\Delta$ um02744 $\Delta$ um02763 in Pathogenitätsanalysen eine noch geringere Virulenz als  $\Delta$ fer2-Mutanten aufweisen. In einem solchen Fall gilt es zu beweisen, dass die putativen Phytosiderophortransporter um02763 und um02744 tatsächlich in der Lage sind, DMA zu transportieren. Zu diesem Zweck wurden die offenen Leserahmen für um02744 und um02763 sowie das Maisgen *ys1* in Hefe exprimiert. Für die Isolation von DMA wurden Maispflanzen in einer hydroponischen

Kultur gezogen. Leider ist es nicht gelungen, sekretiertes DMA aus dem Medium der Pflanzenkultur zu isolieren. Daher steht der Beweis für die Transportaktivität der beiden putativen Phytosiderophortransporter von *U. maydis* noch aus.

### 3.3 Die Bedeutung der Siderophore für die Eisenspeicherung

Neben der Untersuchung der Siderophorbiosynthese stand die Bedeutung der Siderophore für *U. maydis* im besonderen Fokus dieser Arbeit. So konnte ich zeigen, dass die Siderophore essentiell für das Wachstum von *U. maydis* in axenischer Kultur sind (Abbildung 17). Eine Doppelmutante beider NRPS  $\text{FB2}\Delta\text{sid2}\Delta\text{fer3}$  ist in ihrem Wachstum unter Eisenmangelbedingungen stark eingeschränkt. Außerdem spielen die Siderophore eine entscheidende Rolle für die Eisenspeicherung im Cytoplasma und in den Vakuolen von *U. maydis* (Abbildungen 18 und 19). Mutanten, die nur eines der beiden Siderophore synthetisieren können, zeigen einen erhöhten freien Eisenspiegel innerhalb der Vakuolen (Abbildung 19). Diese durch Fluoreszenzmikroskopie des Farbstoffes Calcein-AM indirekt erworbenen Erkenntnisse decken sich mit früheren Beobachtungen. So konnte das fluoreszenzmarkierte Ferrichrom-Analog B9-LRB in den Vakuolen von *U. maydis* lokalisiert werden (Ardon *et al.*, 1998). *U. maydis* nutzt also Siderophore zur Komplexierung freien Eisens in den Vakuolen, um Eisen dort möglicherweise zu speichern.

Des Weiteren konnte ich zeigen, dass Ferrichrom nicht nur in den Vakuolen, sondern auch im Cytoplasma freies Eisen komplexiert. Die Deletionsmutante  $\text{FB2}\Delta\text{sid2}$ , die kein Ferrichrom generieren kann, zeigte eine erhöhte Sensitivität gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Abbildung 18). Die verringerte Toleranz der  $\text{FB2}\Delta\text{sid2}$ -Mutante gegenüber oxidativem Stress kann durch die Bildung von Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion erklärt werden, die bei Anhäufung freien Eisens stattfinden kann. Die Komplexierung von Eisen durch Ferrichrom könnte diese Reaktion unterbinden und somit den oxidativen Stress im Cytoplasma verringern. Ferrichrom A hingegen scheint keine protektive Wirkung zu haben, da  $\text{FB2}\Delta\text{fer3}$ -Mutanten nicht sensitiver gegenüber einer Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  sind als der Wildtyp.

Im Widerspruch zur protektiven Wirkung von Ferrichrom gegen oxidativen Stress konnte ich zeigen, dass die Expression von *sid1* in Abhängigkeit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  reprimiert

wird (Abbildung 24). Dieser scheinbare Gegensatz kann dadurch aufgeklärt werden, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht zur vollständigen Repression der Siderophorbiosynthese führt. So kann der Wildtyp bei Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  immer noch eine geringe Menge Ferrichrom generieren, die einen ausreichenden Schutz gegen oxidativen Stress durch Akkumulation freien Eisens zu bieten scheint. In der Deletionsmutante  $\text{FB2}\Delta\text{sid2}$  ist dies nicht möglich. Die erhöhte Sensitivität von  $\text{FB2}\Delta\text{sid2}$  kann interessanterweise nicht durch Ferrichrom A komplementiert werden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Ferrichrom A vornehmlich in den Vakuolen und nicht im Cytoplasma akkumuliert.

Eine unterschiedliche Bedeutung verschiedener Siderophore findet sich auch bei anderen Pilzen. In *A. fumigatus* spielen die beiden extrazellulären Siderophore Fusarinin C und Triacetylfusarinin C eine entscheidende Rolle für das Wachstum unter Eisenmangelbedingungen (Schrettl *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu ist das intrazelluläre Siderophor Ferricrocin wichtig für die Eisenspeicherung innerhalb der pilzlichen Hyphen (Schrettl *et al.*, 2007). In *C. heterostrophus* findet ebenfalls eine deutliche Aufgabenteilung der Siderophore statt. Während das intrazelluläre Siderophor Ferricrocin für die sexuelle Entwicklung notwendig ist, wird das extrazelluläre Siderophor Coprogen für eine erfolgreiche Infektion von Mais benötigt (Oide *et al.*, 2006, Oide *et al.* 2007).

In *U. maydis* finden sich beide Siderophore sowohl intra- als auch extrazellulär. Ihnen kommen aber verschiedene Funktionen für die intrazelluläre Eisenspeicherung zu. Beide Siderophore dienen als Eisenspeicher in den Vakuolen, aber nur Ferrichrom ist notwendig für die Komplexierung freien Eisens im Cytoplasma. Diese räumliche Verteilung könnte in den unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der beiden Siderophore begründet liegen. Ferrichrom A bindet mit einer deutlich höheren Affinität an Eisen als Ferrichrom. Während die Dissoziationskonstante für Ferrichrom A-gebundenes Eisen bei  $10^{-32}$  M liegt, ist sie für Ferrichrom-gebundenes Eisen mit  $10^{-29}$  M deutlich geringer (Carrano *et al.*, 1979). Um benötigtes Eisen schnell rekrutieren zu können, scheint es daher sinnvoller, Ferrichrom mit der geringeren Bindungsaffinität im Cytoplasma als Eisenspeicher zu nutzen. Die unterschiedliche Lokalisation der beiden Siderophore könnte durch abweichende Affinitäten, unterschiedliche Expression, Lokalisation und Aktivität der identifizierten Siderophortransporter für Ferrichrom und Ferrichrom A ermöglicht werden. Fer6

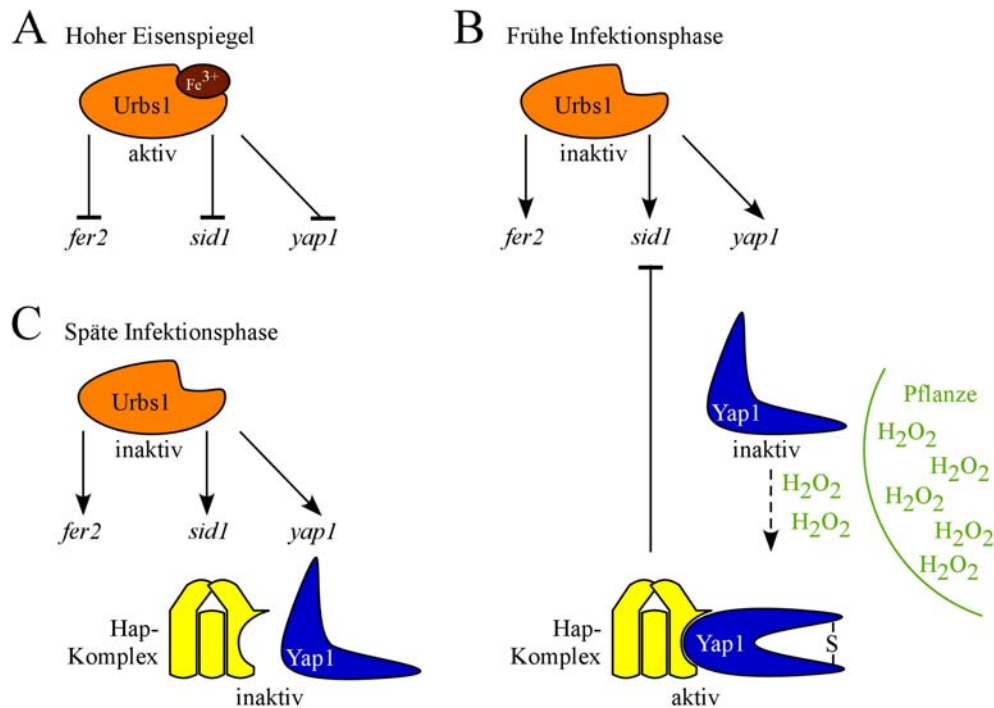
transportiert präferenziell Ferrichrom A, während Cim1 den Transport von Ferrichrom bevorzugt (Abbildung 15).

### **3.4 Bedeutung und Regulation der hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme während des Lebenszyklus von *U. maydis***

Die beiden hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme spielen unterschiedliche Rollen während der Entwicklung von *U. maydis*. Während Deletionen in der Siderophorbiosynthese keinen Einfluss auf die Pathogenität haben (Mei *et al.*, 1993, Abbildung 20), kommt den Siderophoren eine zentrale Bedeutung in axenischer Kultur zu (Abbildung 17). Unter diesen Bedingungen scheint die Affinität des Permease-basierten Systems zu gering, um eine effiziente Eisenaufnahme zu gewährleisten. Das Wachstum in axenischer Kultur unter Eisenmangel ähnelt den natürlichen Bedingungen im Boden und auf der Pflanzenoberfläche. Sobald *U. maydis* die Pflanzenoberfläche penetriert hat und sich im Apoplasten der Pflanze vermehrt, ist die Eisenaufnahme durch die Permease Fer2 wichtig (Eichhorn *et al.*, 2006). Deletionsmutanten von *fer1* und *fer2* zeigen daher eine deutlich verringerte Virulenz im Vergleich zum Wildtyp. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass Pflanzen eine Eisenmangelumgebung für *U. maydis* darstellen, in der es zur Expression des Permease-basierten Systems kommt. Dabei scheint die Eisenkonzentration in der Pflanze höher zu sein als in axenischer Kultur, jedoch gering genug, sodass die Expression des Permease-basierten Systems nicht durch Urbs1 reprimiert wird. Dies spiegelte sich in der konstitutiven Expression von *fer2* während der frühen biotrophen Entwicklung wider (Abbildung 22). Auf Grund der geringen Eisenkonzentration in der Pflanze sollten alle Urbs1-abhängig regulierten Gene exprimiert sein. Dies galt allerdings nicht für das Gen *sid1*, dessen Expression zu Beginn der Infektion nur schwach war. Im Verlauf der Infektion stieg die *sid1*-Expression immer weiter an und erreichte einen Höchststand 10 bis 17 Tage nach der Infektion (Abbildung 22). Im Gegensatz dazu war die Expression von *fer2* zu Beginn der Infektion stark und unterlag nur einer geringen Schwankung. Erst während der späten Infektionsphase fiel die *fer2*-Expression leicht ab. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass zu diesem Zeitpunkt eine hohe Eisenkonzentration innerhalb der Zellen vorlag und dadurch Urbs1 als Repressor fungierte (vgl. Abschnitt



1.2) Die differentielle Regulation der beiden hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme könnte durch den Transkriptionsfaktor Yap1 gesteuert werden. Im Einklang mit dieser Hypothese steht die Beobachtung, dass die Expression von *sid1* durch  $H_2O_2$  reprimiert wird (Abbildung 24). Aus diesen Beobachtungen lässt sich das folgende Modell der Regulation der Eisenaufnahmesysteme von *U. maydis* ableiten (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Regulation der hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme während der biotrophen Entwicklung.** **A.** Bei einem hohen Eisenspiegel kommt es zur Repression der hoch-affinen Eisenaufnahmesysteme durch Urbs1. **B.** Während der frühen Infektionsphase werden *sid1*, *fer2* und *yap1* exprimiert. Yap1 wird in Folge der Bildung von  $H_2O_2$  durch die Pflanze aktiviert und bindet an den Hap-Komplex. Dadurch wird *sid1* reprimiert. **C** Nach der Etablierung des Tumors schwindet die  $H_2O_2$ -Produktion durch die Pflanze (Molina und Kahmann, 2007) und die Expression der Siderophorbiosynthesegene wird induziert.

Bei hohen Eisenkonzentrationen, wie sie etwa in axenischer Kultur herrschen können, wird die Expression von *sid1* und *fer2* durch Urbs1 reprimiert (Eichhorn *et al.*, 2006, Abschnitt 1.2). Die Expression von *yap1* wird dabei ebenfalls eisen-abhängig durch Urbs1 reguliert (Eichhorn *et al.*, 2006). Nach der Penetration der Pflanze, die eine Eisenmangelumgebung für *U. maydis* darstellt, werden *sid1*, *fer2* und *yap1* exprimiert (Abbildung 26B). Als Reaktion auf die Infektion schüttet die Pflanze  $H_2O_2$  aus, wodurch es zur Aktivierung von Yap1 kommt (Molina und Kahmann, 2007). Nach der Aktivierung lokalisiert Yap1 im Zellkern und kann nun, vermittelt durch die Hapkomplex-Interaktionsdomäne, an den Hapkomplex binden. Dadurch kommt es zur

Repression von *sid1*, während *fer2* unbeeinflusst bleibt. Nach Etablierung des Tumorgewebes schwindet die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch die Pflanze und Yap1 wirkt nicht länger reprimierend auf *sid1* (Abbildung 26C). Dadurch kann es zur Synthese der Siderophore während der späten Infektionsphase kommen.

Einen Hinweis auf die Richtigkeit dieses Modells bietet die Beobachtung, dass  $\Delta yap1$ -Mutanten unter Eisenmangel eine bräunlich-rote Farbe annehmen (Molina und Kahmann, 2007, L. Molina pers. Mitteilung). In *A. nidulans* zeigen  $\Delta hapX$ -Deletionsmutanten ebendiese Färbung, die auf die Akkumulation des Protoporphyrin IX zurückzuführen ist (Hortschansky *et al.*, 2007). In dieser Mutante kommt es durch die Deletion von HapX zur Deregulation der Häm-Biosynthese unter Eisenmangel.

Bisher konnte aber noch nicht eindeutig bewiesen werden, dass Yap1 für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängige Repression von *sid1* verantwortlich ist. Zu diesem Zweck soll die Expression von *sid1* und *fer2* in  $\Delta yap1$ -Deletionsmutanten mittels Northern Blot-Anaylsen untersucht werden. Hier sollte es zu einer Deregulation von *sid1* nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum Wachstumsmedium kommen. Des Weiteren ist nicht bekannt, inwiefern die beiden Domänen von Yap1, die Hap-Komplex-Interaktions- und die bZIP-Domäne, an der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängigen Regulation beteiligt sind. Daher wurden Konstrukte zur Deletion jeweils einer der beiden Domänen geplant. Genomweite Transkriptomanalysen mit diesen Mutanten könnten zum Verständnis des Regulationsmechanismus durch Yap1 beitragen. Außerdem wären weitere Untersuchungen des Yap1-Hap-Komplexes notwendig. Zum einen könnten Transkriptionsanalysen von *sid1* in  $\Delta hap2$ -Deletionsstämmen von *U. mayidis* (A. Mendoza-Mendoza, pers. Mitteilung) durchgeführt werden. Findet die Repression von *sid1* durch Interaktion von aktiviertem Yap1 mit dem Hap-Komplex statt, so sollte es in der  $\Delta hap2$ -Mutante zur Deregulation von *sid1* kommen. Eine direkte Interaktion von Yap1 mit dem Hap-Komplex nach Aktivierung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> könnte ferner durch Hefe-zwei-Hybrid- oder Split-GFP-Analysen gezeigt werden.

Es stellt sich die Frage, warum die Siderophorbiosynthese auf diese komplexe Weise während der Infektion reguliert wird. Möglicherweise könnten Siderophore als Elicitoren der Pflanzenabwehr dienen. Eine solche Erkennung der Siderophore durch die Wirtspflanze konnte für die Interaktion zwischen *E. chrysanthemi* und *A. thaliana* nachgewiesen werden (Boughammoura *et al.*, 2007). Eisen-freies Chrysobactin führt zur Induktion der Ferritinbiosynthese in *A. thaliana*, wodurch die Virulenz von

*E. chrysanthemi* verringert wird. (Dellagi *et al.*, 2005). Für diese mögliche Wirkung der Siderophore von *U. maydis* spricht, dass eine Infektion mit  $\Delta urbs1$ -Deletionsmutanten keinen Einfluss auf die Virulenz hatte (Daten nicht gezeigt), die Deletion von *yap1* aber zu einer deutlichen Reduktion der Virulenz führt (Molina und Kahmann, 2007). Es ist möglich, dass ein Teil dieser Reduktion auf die Deregulation der Siderophorbiosynthese durch die Deletion von *yap1* zurückzuführen ist, was zur Erkennung durch die Pflanze führen könnte. In der  $\Delta urbs1$ -Deletionsmutante hingegen wird die Synthese der Siderophore weiterhin durch Yap1 reprimiert. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte die Reaktion der Pflanze durch die Untersuchung von Markergenen der Salicylsäure-abhängigen Immunantwort nach Infiltration der Siderophore gemessen werden. Im Einklang damit sollte eine Deletion von *sid1* im  $\Delta yap1$ -Hintergrund zu einer Erhöhung der Virulenz führen im Vergleich zu  $\Delta yap1$ -Einzelmutanten, da in diesem Fall trotz Deregulation der Siderophorsynthese zu keinem Zeitpunkt Siderophore sekretiert werden können.  $\Delta yap1\Delta urbs1$ -Doppelmutanten sollten hingegen eine weitere Reduktion der Virulenz im Vergleich zu  $\Delta yap1$ -Einzelmutanten aufweisen.

Während der späten Infektionsphase nach Etablierung des Tumorgewebes verliert sich die Repression der Siderophorbiosynthese, da die  $H_2O_2$ -Produktion durch die Pflanze abnimmt und Yap1 nicht mehr aktiviert und in den Nucleus lokalisiert wird (Molina und Kahmann, 2007). Daher steigt die Expression von *sid1* 10 Tage nach der Infektion drastisch an. Dieser Zeitpunkt korreliert mit der Initiation der Sporenbildung und -reifung (Banuett und Herskowitz, 1996). Im Einklang mit dieser erhöhten *sid1*-Expression während der späten Infektionsphase steht die Beobachtung, dass die  $\Delta sid2\Delta fer3$ -Doppeldeletionsmutanten einen Meiosedefekt aufweisen (Abbildung 21). Siderophore scheinen also eine entscheidende Rolle für die Speicherung und Einlagerung von Eisen in die Sporen zu haben. In anderen Pilzen, wie den Ascomyceten *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *N. crassa* und *Penicillium chrysogenum* konnte gezeigt werden, dass Siderophore wichtig für die Keimung der Sporen sind (Schrettl *et al.*, 2007, Horowitz *et al.*, 1976, Charlang *et al.*, 1981). Mutanten dieser Ascomyceten, die einen Defekt in der Siderophorbiosynthese aufweisen, zeigen eine verringerte Keimungsrate. Im Gegensatz dazu sind Sporen der Deletionsmutanten  $\Delta sid2\Delta fer3$  von *U. maydis* nicht in ihrer Keimungsfähigkeit beeinträchtigt (Daten

nicht gezeigt). Vielmehr zeigen sie einen Segregationsdefekt und produzieren diploide Nachkommen. Dieser Meiosedefekt kann nicht durch die äußere Zugabe von Eisen während der Keimung komplementiert werden (Abbildung 21). Auch Sporen des Wildtyps aus einer Infektion von Pflanzen unter Eisenmangel zeigen diesen Phänotyp, wenn sie unter Eisenmangelbedingungen auskeimen (Abbildung 21). Der Meiosedefekt konnte im Falle des Wildtyps durch Infektion eisensupplementierter Pflanzen oder durch Keimung auf einem eisenhaltigen Medium komplementiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Siderophore eine wichtige Rolle als Eisenspeicher in den Sporen spielen.

Welcher Prozess während der Meiose durch den Eisenmangel gestört ist, ist allerdings bislang noch unklar. Das einzige bekannte Protein, das an der Meiose beteiligt ist und für die Ausführung seiner Aufgabe Eisen benötigt, ist Rad32 aus *S. pombe*. Rad32 bindet Eisen durch die Aminosäurereste 25, 65 und 135 (Wilson *et al.*, 1998). Eine Mutation der Aspartatreste 25 und 135 zu Asparagin resultierte in einer verringerten Überlebensrate der Sporen. Eine  $\Delta rad32$ -Deletionsmutante von *S. pombe* zeigte eine verringerte Rekombinationsrate, wies instabilere Chromosomen und einen Defekt in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen auf (Tavassoli *et al.*, 1995). Im Genom von *U. maydis* findet sich das Rad32-Homolog um04704 (Holloman *et al.*, 2008), dessen Funktion während der Meiose aber noch nicht weiter untersucht wurde. In um04704 finden sich die drei konservierten Asparaginreste, die in Rad32 für die Bindung von Eisen verantwortlich sind. Eine Mutation dieser Aminosäuren könnte zeigen, ob die Eisenbindung essentiell für die Funktion von um04704 ist. Des Weiteren könnte untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt der Ablauf der Meiose unterbrochen wird. Für eine solche Analyse wurden Deletionen von *sid1* in kompatiblen *U. maydis*-Stämmen durchgeführt, in denen GFP-markiertes Tubulin 1 konstitutiv exprimiert wird (Steinberg *et al.*, 2000). In diesen Stämmen könnte der Ablauf der Meiose mikroskopisch verfolgt werden.

In *Microbotryum violaceum* wurde ein ähnlicher Phänotyp wie in *U. maydis* beobachtet. Bei einer Tetradenanalyse einer Kreuzung des *M. violaceum* Wildtyps mit einer Mutante, die keine Siderophore produzierte, wurden unerwartet viele Genotypen beobachtet (Birch und Ruddat, 2005), was ebenfalls durch einen Meiosedefekt erklärt werden könnte.

Interessanterweise ist die Expression der beiden Siderophorimporter Fer6 und Cim1 13 Tage nach der Infektion 7fach bzw. 5fach geringer als auf der Pflanzenoberfläche

(M. Vraněš, pers. Mitteilung). Dies lässt darauf schließen, dass die Siderophore weniger der Eisenaufnahme, als vielmehr der Eisenspeicherung dienen. Im Einklang mit dieser Beobachtung zeigen Sporen aus einer Infektion kompatibler  $\Delta urbs1$ -Mutanten eine deutlich verringerte Keimungsrate (Daten nicht gezeigt). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es in diesen Mutanten nicht zur Urbs1-abhängigen Repression des Permease-basierten Systems während der Sporenreifung kommt. Durch die Akkumulation freien Eisens, die in einer Schädigung der DNA resultieren kann, sind die Sporen weniger lebensfähig. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre es interessant, die Keimungsfähigkeit von  $\Delta fer2\Delta urbs1$ -Doppelmutanten zu untersuchen. Außerdem könnte die Expression der Komponenten der beiden Eisenaufnahmesysteme während der Infektion durch  $\Delta urbs1$ -Deletionsmutanten analysiert werden. In dieser Mutante sollte die Expression von *sid1* wie im Wildtyp durch Yap1 reprimiert werden, während die Expression von *fer2* während der späten Infektionsphase dereguliert sein sollte.

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme eine wichtige Rolle während der verschiedenen Phasen des Lebenszyklusses spielt. Dies führte zu einem tieferen Verständnis der Interaktion von *U. maydis* mit seiner Wirtspflanze Mais. Zusätzlich ist es mir gelungen, alle noch fehlenden Enzyme der Siderophorbiosynthese in *U. maydis* zu identifizieren und so die Ferrichrom- und Ferrichrom A-Synthesewege zu den bestuntersuchtesten Siderophorbiosynthesewegen zu machen. Ich konnte durch die Identifikation zweier Siderophorimporter und den ersten pilzlichen Siderophorexporter den Grundstein für die Analyse der Transportmechanismen legen, die für pilzliche Siderophortransporter bislang gänzlich unerforscht sind.

Damit hat meine Arbeit vielfältige neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Synthese, dem Transport, der Funktion und der Regulation der Siderophore geliefert.



## 4. Material und Methoden

### 4.1. Chemikalien, Puffer, Lösungen, Enzyme und Kits

#### Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Riedel-de Häen, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen.

#### Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach (Ausubel *et al.*, 1987) und (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt, Einzelheiten dazu siehe (Brachmann, 2001). Spezielle Puffer, Lösungen und Medien sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

#### Enzyme

Restriktionsenzyme und Phusion-Polymerase wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen, die T4-Ligase stammte von Roche, bei der Taq-DNA-Polymerase handelte es sich entweder um eine Laborpräparation oder sie wurde über Fermentas bezogen.

#### Verwendete Kits und sonstiges Material

In dieser Arbeit wurden folgende Kits verwendet:

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten aus PCR-Ansätzen wurden die Kits QIAquick und Minelute PCR Purification Kits (Qiagen) verwendet. Für die Elution von Fragmenten aus Agarosegelen wurden die Kits QIAquick und Minelute Gel Extraction Kits (Qiagen) gebraucht. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der Vektor pCR2.1-TOPO (TOPO-TA Cloning Kit von Invitrogen) verwendet. DIG High Prime und PCR-DIG-labeling Mix zur Dioxigenin-Markierung von DNA-Sonden stammten von der Firma Roche. Für die Expressionsanalysen mittels qRT-PCR wurde das SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) verwendet. Mit ihm wurde cDNA hergestellt und die anschließende qRT-PCR durchgeführt. Für die vorangegangene Aufreinigung der isolierten RNA wurde das RNeasy-Kit von Qiagen benutzt.

Zusätzlich verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

### 4.2 Kultivierungsmethoden

#### 4.2.1 Kultivierung von *U. maydis*

*U. maydis*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Für die Lagerung von *U. maydis*-Kulturen bei -80°C wurden 3 ml YEPSL-Medium mit Zellen von Festmedien angeimpft und über Nacht bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden 800 µl dieser Kultur mit 800 µl NSY-Glycerin-Medium in Schraubdeckelzentrifugenröhrchen vermischt und sofort bei -80°C eingefroren.

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet:

#### YEPSL-Medium

(modifiziert nach Tsukuda *et al.*, 1988):

10 g Yeast Extract  
10 g Pepton  
10 g Saccharose  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

#### PD-Medium

24 g Potato Dextrose Broth  
20 g Bacto-Agar

#### CM-Vollmedium

(Banuett and Herskowitz, 1989; Holliday, 1974):

1,5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
2,5 g Casamino Acids  
0,5 g DNA  
1 g Yeast Extract  
62,5 ml Salz-Lösung  
mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt  
10 ml Vitamin-Lösung  
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
nach dem Autoklavieren:  
1 % (v/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c.)

**Salz-Lösung (Holliday, 1974):**

16 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 4 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
 8 g KCl  
 4 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$   
 1,32 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$   
 8 ml Spurenelement-Lösung  
 mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

**Vitamin-Lösung (Holliday, 1974):**

100 mg Thiamin  
 50 mg Riboflavin  
 50 mg Pyridoxin  
 200 mg Kalziumpantothenat  
 500 mg p-Aminobenzoesäure  
 200 mg Nikotinsäure  
 200 mg Cholinchlorid  
 1000mg myo-Inositol  
 mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

**NSY-Glycerin (Einfriermedium)**

1 g Yeast Extract  
 8 g Nutrient Broth  
 5 g Saccharose  
 800 ml 87% Glycerin  
 mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l auffüllen

**Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974) :**

60 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
 140 mg  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$   
 400 mg  $\text{ZnCl}_2$   
 40 mg  $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$   
 100 mg  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$   
 40 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$   
 mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

**Ammonium-Minimalmedium (AMM, Holliday, 1974):**

3 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
 62,5 ml Salz-Lösung (Holliday, 1974)  
 mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 980 ml aufgefüllt  
 mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
 nach dem Autoklavieren:  
 1 % (v/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c.)

Für Medien mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle (CM-Ara) wurde nach dem Autoklavieren Arabinose statt Glucose in einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2% zugegeben. Medienzusätze wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carboxin (2  $\mu\text{g/ml}$ ), Hygromycin (200  $\mu\text{g/ml}$ ), ClonNAT (150  $\mu\text{g/ml}$ ) und Phleomycin (40  $\mu\text{g/ml}$ ). Im Fall der Selektion mit Phleomycin auf Festmedien wurde zusätzlich Tris-HCl, pH 8,0 in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt, da ansonsten das Antibiotikum wegen der Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert wird. Aktivkohle (Charcoal, Sigma-Aldrich) wurde in einer Enkonzentration von 1% zu PD-Festmedium gegeben.

**Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis***

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der  $\text{OD}_{600}$  die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die  $\text{OD}_{600}$  des jeweiligen Kulturmediums verwendet.  $\text{OD}_{600} = 1,0$  entspricht etwa  $1\text{-}5 \times 10^7$  Zellen/ml.

**Test auf Paarungskompetenz und filamentöses Wachstum**

Kolonien von *U. maydis* wurden von Platten in 3 ml YEPS-Flüssigkulturen inokuliert. Die Zellen wurden durch Inkubation über Nacht bei 28°C bis zu einer Zelldichte von  $\text{OD}_{600} = 0,5$  bis 1,0 herangezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (3500 Upm, 5 min, Heraeus Multifuge 4KR) und das Pellet anschließend in  $\text{H}_2\text{O}$  so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa  $\text{OD}_{600} = 2,0$  lag. Für die Kreuzungen wurden gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner miteinander gemischt. Von diesen Ansätzen wurden 10  $\mu\text{l}$  auf eine PD-Charcoal-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 - 48 h bei Raumtemperatur unter Luftabschluss inkubiert.

**Test auf Pathogenität**

Bei der Spritzinfektion wurden 200 - 250  $\mu\text{l}$  einer Pilzsuspension (in Wasser,  $\text{OD}_{600} = 2$ ) in das Innere des Blattwirtels von 7 Tage alten Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam gespritzt. Die Stämme wurden vorher über Nacht bei 28°C in YEPSL-Flüssigkultur zu einer  $\text{OD}_{600} = 0,8$  angezogen. Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.500 Upm, 5 min, Heraeus Multifuge 4KR) geerntet und in Wasser zu einer  $\text{OD}_{600} = 2$  aufgenommen. Die beiden Suspensionen kompatibler Stämme wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Die Symptome der



Infektion wurden am Tag 14 nach der Infektion analysiert. Jede Pflanze wurde entsprechend des stärksten Symptoms in einer der folgenden Kategorien einsortiert. Kategorie 1: gesunde Pflanzen, Kategorie 2: Pflanzen mit Chlorose, Kategorie 3: Pflanzen mit einer Schwellung der Ligula, Kategorie 4: Kleine Tumore mit einem Durchmesser kleiner als 3 mm, Kategorie 5: Tumor mit einem Durchmesser größer als 3 mm an Blättern und/oder Stamm, Kategorie 6: Große Tumore, die die Wachstumsachse der Pflanze beeinträchtigen, Kategorie 7: Tote Pflanzen.

#### Sporenkeimung

Für die Isolation der Sporen aus Tumorgewebe wurden die Tumore für zwei Tage bei 37°C getrocknet. Ein Teil des Gewebes wurde mit 1 ml Wasser in einem Mörser zerkleinert. Diese Sporensuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und der Mörser mit 1 ml Wasser durchgespült. Um Bakterien, Pilze und *U. maydis*-Sporidien abzutöten wurden die 2 ml Sporensuspension mit 2 ml 3 % CuSO<sub>4</sub>-Lösung versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wurden die Sporen in 500 µl Wasser aufgenommen. Dieser Lösung wurden 30 µl Ampicillin und 30 µl Tetracyclin zugesetzt und 1:10- und 1:100 mit Wasser, dem ebenfalls Antibiotika zugesetzt wurden, verdünnt. Anschließend wurden diese Verdünnungen und die unverdünnte Sporensuspension auf CM-Platten ausplattiert und für 2 Tage bei 28°C inkubiert. Die gekeimten Sporen wurden auf CM-Medium vereinzelt und für den Test auf filamentöses Wachstum in CM-Flüssigmedium angeimpft.

#### Protoplastierung und Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Schulz *et al.*, 1990) und (Gillissen *et al.*, 1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 3 ml YEPSL-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Von dieser Vorkultur wurde anschließend 100 µl in 50 ml frisches YEPSL-Medium überführt und über Nacht bei 28°C bis zu OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,8 geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3.200 Upm, 5 min, Heraeus Multifuge 4KR) pelletiert, mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung wurde mikroskopisch verfolgt. Die zigarrenförmigen Zellen nehmen nach der Lyse der Zellwand eine kugelige Form ein. Nach Protoplastierung (5-15 min) der Hälfte der Zellen wurden 20 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10minütige Zentrifugation bei (2.300 Upm, 4°C, Heraeus Multifuge 4KR) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschschritt mit 10 ml SCS wiederholt. Anschließend wurden die Zellen mit 20 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C aufbewahrt werden.

Zur Transformation von Deletionskonstrukten wurden 70 µl Protoplasten mit 5 µl durch PCR amplifiziertes k.o.-Konstrukt (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 10 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 4 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf Antibiotikum-haltige PD-Platten vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert

#### SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8  
1 M Sorbitol  
in ddH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

#### STC:

10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
100 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 M Sorbitol  
in ddH<sub>2</sub>O., sterilfiltriert

#### STC/PEG:

15 ml STC  
10 g PEG4000

#### Regenerationsagar (Schulz *et al.*, 1990)

a) Top-Agar:  
1,5% (w/v) Bacto-Agar  
1 M Sorbitol  
in YEPS-Medium (Tsukuda *et al.*, 1988)  
b) Bottom-Agar:  
wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes  
Antibiotikum

#### 4.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde als Flüssigkultur in SD- oder YEPD- Flüssigmedium bei 200 Upm bei 28°C inkubiert. Für die Kultivierung auf Festmedien wurden die Stämme unter aeroben Bedingungen auf SD- oder YEPD-Agarplatten bei 28°C inkubiert.

Für die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden folgende Medien verwendet

##### YEPD:

10 g Hefeextrakt  
20 g Pepton  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt  
nach dem Autoklavieren:  
2 % (v/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c.)

##### SD:

6,7 g Yeast Nitrogen Base  
1,4 g Drop Out  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt  
nach dem Autoklavieren:  
2 % (v/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c.)

##### Drop Out minus Uracil:

0,2 g Aminobenzoesäure  
2 g Alanin  
2 g Arginin  
2 g Asparagin  
2 g Cystein  
2 g Glutamin  
2 g Glutamat  
2 g Glycin  
2 g Inositol  
2 g Isoleucin  
2 g Lysin  
2 g Methionin  
2 g Phenylalanin  
2 g Prolin  
2 g Serin  
2 g Tyrosin  
2 g Valin

##### Drop Out minus Methionin:

0,2 g Aminobenzoesäure  
2 g Alanin  
2 g Arginin  
2 g Asparagin  
2 g Cystein  
2 g Glutamin  
2 g Glutamat  
2 g Glycin  
2 g Inositol  
2 g Isoleucin  
2 g Lysin  
2 g Phenylalanin  
2 g Prolin  
2 g Serin  
2 g Tyrosin  
2 g Valin

Für die Herstellung von Agarplatten wurden 2 % Agar zugegeben.

Für **SD-Ura** wurde 400 ml SD-Medium, das mit Drop Out minus Ura angesetzt wurde, nach dem Autoklavieren folgende Lösungen zugesetzt:

2 ml Tryptophan (10 g/l), 2 ml Histidin (10 g/l), 10 ml Leucin (10 g/l), 5 ml Threonin (40 g/l), 8 ml Adenin (2 g/l).

Für **SD-Ura+Fe+Glc** wurden dem SD-Ura-Medium 10 µM FeSO<sub>4</sub> und 2% Glucose zugesetzt. Das Medium **SD-Ura+Fe+Gal+Raf** enthielt statt Glucose 1% Galactose und 2 % Raffinose.

Für **SD-Ura-Met** wurde 400 ml SD-Medium, das mit Drop Out minus Met angesetzt wurde nach dem Autoklavieren folgende Lösungen zugesetzt:

2 ml Tryptophan (10 g/l), 2 ml Histidin (10 g/l), 10 ml Leucin (10 g/l), 5 ml Threonin (40 g/l), 8 ml Adenin (2 g/l).

#### Bestimmung der Zelldichte bei *S. cerevisiae*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub>= 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml.

#### Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation wurden *S. cerevisiae*-Stämme in 3 ml YEPD-Medium für 8 bis 10 h bei 200 Upm und 28°C inkubiert und anschließend 100 µl dieser Kultur in 50 ml frisches YEPD-Medium überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 200 Upm und 28°C wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,5 wachsen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3500 Upm, 5 min, Heraeus Multifuge 4KR) pelletiert und mit 15 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml TE/LitAc

resuspendieren und zu je 200 µl aliquotiert. Ein Aliquot wurde mit 10 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) versetzt, die zuvor bei 99°C denaturiert und auf Eis für 10 min abgekühlt wurde. Zu den Zellen wurden 10 µl Plasmid-Lösung und 1,2 ml LitAc/PEG gegeben. Der Transformationsansatz wurde 1 h bei 30°C und für 15 min bei 45 °C inkubiert. Durch kurzes Zentrifugieren (5 sec, 13000 rpm) wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 100 µl TE resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde auf Selektionsplatten (SD-Ura) ausgestrichen und für 1 bis 2 Tage bei 28°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Transformanden wurden mit Zahnstochern auf Selektionsplatten (SD-Ura) vereinzelt.

**10 x TE**

1,21 g Tris-Base  
0,37 g Na<sub>2</sub>-EDTAx2H<sub>2</sub>O  
pH=7,5  
mit H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen, autoklavieren

**TE/LitAc:**

1 Vol 10 x TE  
1 Vol 10 x LitAc  
8 Vol H<sub>2</sub>O

**10 x LitAc (1M)**

6,6 g LitAc  
mit H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen  
auf pH=7,5 mit Essigsäure einstellen  
autoklavieren

**LitAc/PEG**

8 Vol 50% PEG3350  
1 Vol 10 x TE  
1 Vol 10 x LitAc

**Expression der Siderophorimporterkandidaten in *S. cerevisiae***

Die Kandidaten für Siderophorimport, *fer6*, *fer7*, *cim1*, *cim2* und *cim3*, und der endogene Siderophorimporter *arn1* wurden mittels PCR amplifiziert und in das Plasmid pYES2 kloniert (siehe Abschnitt 4.4). Die entstandenen Plasmide wurden in die *S. cerevisiae*-Stämme  $\Delta fer3$  und  $\Delta fet3\Delta arn1-4$  transformiert. Dazu wurde der Transformationsansatz auf SD-Ura-Platten ausgestrichen, die mit 2 % Glucose und 10 µM Eisen supplementiert wurden (SD-Ura+Fe+Glc). Nach eintägiger Inkubation bei 28°C unter aeroben Bedingungen wurden die Transformanden auf SD-Ura+Fe+Glc-Platten vereinzelt. Nach Inkubation bei 28°C für 2 Tage wurden Einzelkolonien in je 10 ml SD-Ura+Fe+Glc-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 200 Upm und 28°C inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,3 und 0,7 wurde je 1 ml der Kulturen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 13000 Upm für 2 min pelletiert. Die Zellpellets wurden zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und so in Wasser aufgenommen, dass eine OD<sub>600</sub>=1 erreicht wurde. Anschließend wurden die Kulturen unverdünnt und in 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnungen (in Wasser) in eine sterile 96Well-Platte gegeben und mittels eines Metalligels auf folgende Platten aufgetropft:

- SD-Ura+Glc supplementiert mit Ferrichrom und BPS (Bathophenanthrolin-Disulfonsäure-Dinatriumsalz):  
Glucose führt zur Repression der putativen Siderophorimporter. Daher wachsen nur die Stämme im  $\Delta fet3$ -Hintergrund auf diesem Medium.
- SD-Ura+Gal+Raf supplementiert mit Ferrichrom und BPS:  
Galaktose führt zur Induktion des *gal1*-Promotors in pYES2 und dadurch zur Expression der putativen Siderophorimporter. Raffinose dient als Kohlenstoffquelle. Alle Stämme, die einen funktionalen Ferrichromimporter exprimieren, können auf diesem Medium durch die Aufnahme von Ferrichrom wachsen.
- SD-Ura+Glc supplementiert mit Ferrichrom A und BPS:  
Glucose führt zur Repression der putativen Siderophorimporter. Daher wachsen nur die Stämme im  $\Delta fet3$ -Hintergrund auf diesem Medium.
- SD-Ura+Gal+Raf supplementiert mit Ferrichrom A und BPS:  
Glaktose führt zur Induktion des *gal1*-Promotors in pYES2 und dadurch zur Expression der putativen Sideophorimporter. Raffinose dient als Kohlenstoffquelle. Alle Stämme, die einen funktionalen Ferrichrom A-Importer exprimieren, können auf diesem Medium durch die Aufnahme von Ferrichrom A wachsen.
- SD-Ura+Glc supplementiert mit Eisen:  
Diese Platten dienten als Kontrolle, da alle Stämme durch die Zugabe von Eisen wachsen können.
- SD-Ura+Gal+Raf supplementiert mit Eisen:  
Diese Platten dienten ebenfalls als Kontrolle, um eine schädigende Wirkung durch die Expression der Importkandidaten ausschließen zu können. Sollte ein Stamm nicht auf diesem Medium, aber auf den SD-Ura+Glc+Fe-Platten wachsen können, kann davon ausgegangen werden, dass die Expression des Kandidatengens zum Absterben der Zellen führt.

Ferrichrom, Ferrichrom A und FeSO<sub>4</sub> wurden den Platten jeweils in einer Konzentration von 10 µM zugesetzt. BPS (Sigma-Aldrich), ein Eisenchelator, wurde den Platten in einer Konzentration von

100 µM zugefügt, um eine Eisenaufnahme mittels niedrig affiner Metalltransporter ausschließen zu können.

Nach drei Tagen Inkubation bei 28°C wurde das Wachstum der Hefestämme ausgewertet.

#### **Expression von *U. maydis yap1* und *S. cerevisiae hap4* in *S. cerevisiae***

Wie für die Expression von *yap1* und *hap4* wurden die offenen Leserahmen amplifiziert und in das Plasmid p416MET25 kloniert (siehe Abschnitt 4.4). Die entstandenen Plasmide wurden in den Hefedeletionsstamm  $\Delta hap4$  transformiert. Der Stamm  $\Delta hap4$  ist nicht in der Lage, nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen wie Lactat zu verstoffwechseln, da er seinen Metabolismus nicht von fermentierbaren auf nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen umstellen kann (Pinkham und Guarente, 1985). Die Transformanden wurden auf SD-Ura-Met+Glc-Platten selektioniert, die mit 1 mM Methionin supplementiert wurden. Die entstandenen Transformanden wurden in SD-Ura-Met+Glc+1 mM Methionin-Flüssigmedium inokuliert und wie oben beschrieben auf folgende Platten aufgetropft:

- SD-Ura-Met supplementiert mit 0,13 mM Methionin und 2 % Glucose:  
Uracil dient als Selektionsmarker für das Plasmid. Die geringe Methioninkonzentration reicht gerade aus, um ein Überleben der Hefezellen zu garantieren. Außerdem kommt es unter diesen Bedingungen zur Expression von *yap1* und *hap4*, da der *met25*-Promotor nicht reprimiert wird.  
Durch die Zugabe von Glucose sind die Transformanden aber nicht auf Umstellung ihres Metabolismus angewiesen. Diese Platten dienten daher als Wachstumskontrolle.
- SD-Ura-Met supplementiert mit 0,13 mM Methionin und 10 mM Lactat:  
Nur durch die Expression von *hap4* oder eines funktionalen *hap4*-Homologs sind die Zellen in der Lage, Lactat als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Diese Platten stellten daher die Testplatten dar.
- SD-Ura-Met supplementiert mit 0,13 mM Methionin und 2 % Glucose:  
Diese Platten dienten als Wachstumskontrolle, um sicherzustellen, dass die Expression von *yap1* und *hap4* nicht schädigend wirkt.

Nach drei Tagen Inkubation bei 28°C wurde das Wachstum der Hefestämme ausgewertet. Die Expression von *yap1* führte nicht zur Komplementation der  $\Delta hap4$ -Mutanten. Die Expression des endogenen *hap4* hingegen ermöglichte das Wachstum auf Lactat-haltigen Platten.

#### **4.2.3 Kultivierung von *E. coli***

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- sowie LB-Flüssigmedien und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). *E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp Festmedien angeimpft.

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden folgende Medien verwendet:

##### **YT-Festmedium (Sambrook 1989) :**

8 g Trypton  
5 g Hefe-Extrakt  
5 g NaCl  
16 g Bacto-Agar (Difco)  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

##### **LB-Medium (Sambrook 1989):**

10 g Trypton  
5 g Hefe-Extrakt  
10 g NaCl  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

##### **dYT-Medium (Sambrook 1989):**

16 g Trypton  
10 g Hefe-Extrakt  
5 g NaCl  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

Medienzusätze wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml in N,N-Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO)), Agar (2g/l).

#### **Bestimmung der Zelldichte von *E. coli***

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung

der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 10<sup>9</sup> Zellen/ml.

#### **Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen**

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub> zugesetzt wurden, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation (3.000 Upm, 15 min und 4°C Heraeus Biofuge fresco) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 ml eiskalter RFI-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Biofuge fresco), der Überstand abgenommen, die Zellen in 1,5 ml eiskalter RFII-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 30 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurde je ein Aliquot Zellen (30 µl) auf Eis aufgetaut und mit 270 µl RF2-Puffer vermischt. Pro Transformationsansatz wurden 55 µl der verdünnten Zellen mit 5 µl Plasmidlösung (1-5 ng DNA) bzw. Ligationsansatz versetzt und 5 bis 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 500 µl dYT-Medium versetzt und 30 bis 60 min bei 37°C mit 500 Upm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1 min, 5000 Upm), 400 µl des Überstandes abgenommen. Die Zellen wurden im restlichen Medium resuspendiert und auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

#### **RFI-Lösung**

100 mM RbCl  
50 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
30 mM K-Acetat  
10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15% (v/v) Glycerin  
in ddH<sub>2</sub>O  
mit Essigsäure auf pH 5,8  
einstellen und sterilfiltrieren

#### **RFII-Lösung**

10 mM MOPS  
10 mM RbCl  
75 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15% (v/v) Glycerin  
in ddH<sub>2</sub>O  
mit NaOH auf pH 5,8  
einstellen und sterilfiltrieren

#### **4.2.4 Kultivierung von *Zea mays***

Für alle Experimente wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

#### **Kultivierung von Mais in Erde**

Jeweils 4 Maissamen wurden in Gartenerde des Typs T (Archut Fruhstorfer Erde, Deutschland) ausgebracht. Dabei befanden sich die Samen ca. 7 cm unter der Oberfläche. Die Keimlinge wurden täglich mit Leitungswasser gegossen. Für die Durchführung von Pathogenitätsstudien erfolgte eine Inokulation mit kompatiblen *U. maydis*-Stämmen 7 Tage nach der Aussaat.

#### **Kultivierung von Mais in Vermiculit**

Jeweils 5 Maissamen wurden in Vermiculit (Dämmstoff-Fabrik Klein GmbH, Deutschland) ausgebracht. Dabei befanden sich die Samen ca. 7 cm unter der Oberfläche. Jeden zweiten Tag wurden die Keimlinge mit Pflanzendünger M (modifiziert nach Bécard und Fortin, 1988) gegossen. An den übrigen Tagen erfolgte eine Wässerung mit Leitungswasser.

#### **Eisenfreier Pflanzendünger M**

Zusammensetzung fertiger Dünger (1 l)

Makroelemente	25 ml
Calcium	5 ml
Mikroelemente	1 ml
Phosphat	1 ml
Vitamine	10 ml

Makroelemente (1l)		Endkonzentration im fertigen Dünger:
KNO <sub>3</sub>	3,2 g	0.8 µM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	29,2 g	4.7 µM
KCl	2,6 g	0.89 µM

Mikroelemente (1l)		
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	6 g	33.7 µM
NaI	0,6 g	4 nM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5 g	24.2 nM
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,65 g	9.2 nM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0024 g	9.9 pM
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,13 g	0.8 nM

Calcium (1l)		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	35,28 g	1.2 µM

Phosphat (1l)		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,8 g	35.3 nM

Vitamine:		
Glycine	0,3 g	40 nM
Myoinositol	5 g	278 nM
Nikotinsäure	50 mg	81.3 pM
Pyridoxin-HCl	10 mg	0.5 nM
Thiamin- HCl	10 mg	0.3 nM

Alle Lösungen wurden auf 1 l mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

#### Eisenhaltiger Pflanzendünger M

Für diesen Dünger wurde der eisenfrei Dünger M mit 1,6 g/l FeCl<sub>3</sub> und 1,6 g/l Na-EDTA versetzt.

#### Kultivierung in hydroponischer Kultur

Für die Keimung wurden Filterpapiere (Whatman-Papier) mit gesättigter CaSO<sub>4</sub>-Lösung getränkt und Maissamen im Abstand von und ca. 1 cm aufgelegt. Die Filterpapiere wurden aufgerollt, aufrecht in einen Bottich mit ca. 100 ml gesättigter CaSO<sub>4</sub>-Lösung gestellt, abgedunkelt und für 3 Tage bei 28°C inkubiert. Nach der Keimung wurden die Keimlinge in Flüssigkulturen umgesetzt. Dazu wurden Schalen mit Medium gefüllt, mit Alufolie abgedeckt und Löcher in die Folie gestochen. In diese Löcher wurden die Wurzeln der Keimlinge vorsichtig eingeführt. Nach vier Tagen im Gewächshaus hatten die Keimlinge typischerweise drei Blätter. Für die hydroponische Kultur wurden Töpfe mit einer Bagasungseinrichtung versehen und mit einer Aquarienpumpe (Eheim 400) verbunden. In die Töpfe wurde Medium gefüllt. Die Maiskeimlinge wurden mit einem Schaumstoffkragen umgeben und in vorgebohrte Löcher eines Deckels eingeführt, der auf die Töpfe aufgesetzt wurde. Dabei sollte das Korn unterhalb des Schaumstoffs liegen. Zu diesem Zeitpunkt fand, falls erforderlich, eine Infektion mit *U. maydis* statt. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt.

#### Medium für die hydroponische Kultur (nach E. Scheuermann, Uni Hohenheim)

Makroelemente		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,4723 g	2,0 mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,12,2 g	0,7 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,123 g	0,5 mM
KCl	00,075 g	1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0136 g	0,1 mM

Mikroelemente		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		1 µM
MnSO <sub>4</sub>		0,5 µM
ZnSO <sub>4</sub>		0,5 µM
CuSO <sub>4</sub>		0,2 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		0,07 µM
NaEDTA		100 µM
FeCl <sub>3</sub> (III)		100 µM

## 4.3 Oligonukleotide

Tabelle 2: Oligonukleotide für die Generation von Konstrukten

Konstrukt-name	Primer-name	Sequenz in 5'-3'Richtung	Fragment	Restriktionsstelle	Selektionsmarker
<b>Für die Herstellung von Deletionskonstrukten</b>					
k.o.- Konstrukt <i>fer3</i>	FL17	CGGAAGCTATGCTGGTCC	linke Flanke		Hyg <sup>a</sup>
	FL18	CACGGCCTGAGTGGCCCAGTTTCGAAGGCCGTGG	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	FL19	GTGGGCCATCTAGGCCATCTTCGGTCAGGGTCG	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	FL20	CCGAGACGTGGTCTTCTCT	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>fer4</i>	BW19	TGCGGGCAACCTTTAATCC	linke Flanke		Cbx
	BW20	TGACGGCCATCTAGGCCATGGCACGAGTTGTGAAGC	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW21	TAGCGGCCTGAGTGGCCTTCTTGACGGGCTACTCG	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW22b	ATTGGTGCGGAAGGCTTCGG	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>fer5</i>	BW23	GGTTAAGCGCCTATAACC	linke Flanke		Phleo
	BW24	TGACGGCCATCTAGGCCCTTGTGCTGCTGCATCTTGG	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW25	TAGCGGCCTGAGTGGCCATCTCGTGGTAAACATCC	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW26	TCGCTTTGGCGTGTGACTTCC	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>fer6</i>	BW27	GCATAGATTGCACTCCTACC	linke Flanke		Hyg <sup>a</sup>
	BW28	TGACGGCCATCTAGGCCAAATAAGCGCGGCTGGTGACCC	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW29	TAGCGGCCTGAGTGGCCTGCGGGCAACCTTTAATCC	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW30	GACAAAGGCGGCCATACCATCC	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>fer7</i>	FL29	GTGGGCCATCTAGGCCGGAATGGTCGCGTTGGC	linke Flanke	<i>SfiI</i>	Cbx
	FL30	CCTAGAACC CGCATGGTC	linke Flanke		
	BW33	TAGCGGCCTGAGTGGCCGACATGATGGCAGATGATTGG	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW34	ATCGAGTGATGGCCCTACG	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>fer8</i>	BW31	AATGGCCTAGCGAGAACC	linke Flanke		Nat
	BW32	TGACGGCCATCTAGGCCACCGAACAGCATCCACGATCC	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW43	TACGGGCCTGAGTGGCCAGCGTAGGATGCTCCTAGAAC	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW6	TTCTTTGCGCTCCGCTTACG	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>sid1</i>	BW39	AACTCTGACGGGCTGTATCG	linke Flanke		Nat
	BW40	TGACGGCCATCTAGGCCAACCGCATCAAGTGCAGCAACG	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW41	TACGGGCCTGAGTGGCCGTCAGAGGAATCCACACTTACC	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW42	TGCTTTCGCGTTGTCACTTTGG	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>act1</i>	BW140	GTGGTTCGAGGGATGGGTAG	linke Flanke		Phleo
	BW141	TGACGGCCATCTAGGCCACGCTGAATGCAAAGTG	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW142	TACGGGCCTGAGTGGCCACCATGTTGCCGGCTGAAG	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW143	AAGTTGAGCGCGTTTACTCC	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>act2</i>	BW132	CGGGTCTACGCCATACAGAG	linke Flanke		Nat
	BW133	TGACGGCCATCTAGGCCTAGGCACGATACGCCCGATG	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW134	TACGGGCCTGAGTGGCCATTGTGAAGAGGCACAGAG	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW135	GCATCACCGTCCGTTATGAG	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>act3</i>	BW136	TGGCTACAAGACGACACAAC	linke Flanke		Cbx
	BW137	TGACGGCCATCTAGGCCAAGGTGCGAGTCAGTATG	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW138	TACGGGCCTGAGTGGCCTCCCTATCGGATCGGGTCTC	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW139	AATTTCGAGACCGACCTGTG	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>act4</i>	BW144	CGTTGGTGTCTTGGCATAAC	linke Flanke		Hyg <sup>b</sup>
	BW145	TGACGGCCATCTAGGCCATCTTCATCGTCCCAAGAC	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW146	TACGGGCCTGAGTGGCCGAACAAGGACACGGGTAATG	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW147	CTCAGCTTCATTTCATCAC	rechte Flanke		

Konstrukt- name	Primer name	Sequenz in 5´-3´Richtung	Fragment	Restrik- tionsstelle	Selektions- marker
k.o.- Konstrukt <i>cim1</i>	BW165	GCGGCACCTACTTGTTC	linke Flanke		Hyg <sup>b</sup>
	BW166	TGACGGCCATCTAGGCCGAGCGAGAACGAGTCCACTG	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW167	TACGGGCCTGAGTGGCCAGAGATGAGGAGGGAAAAGAC	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW168	CGAACCGGCTGTTGAATAC	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>cim2</i>	BW169	GGGTGAAAGAGACTACCTAC	linke Flanke		Hyg <sup>b</sup>
	BW170	TGACGGCCATCTAGGCCCTCGACTGGCGTATCATC	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW171	TACGGGCCTGAGTGGCCGCACTCCTATTACAG	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW172	GCCTGCCACCTGTTACAAAG	rechte Flanke		
k.o.- Konstrukt <i>cim3</i>	BW181	CTCTCCTTGGCTCTTATGTG	linke Flanke		Hyg <sup>b</sup>
	BW182	TGACGGCCATCTAGGCCGCTACCAATCCCTCAACTG	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW183	TACGGGCCTGAGTGGCCGGGAGTTGAGGAAGCATTGG	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW184	CCAACACTGCCGACTAGTGC	rechte Flanke		
Für die Herstellung der <i>pcrg1::hcs1</i> -Promotorfusion					
<i>pcrg1::hcs1</i>	BW163	CTGACGGCCATCTAGGCCTAGGCGTCGTAGGCTTTGTC	linke Flanke	<i>SfiI</i>	Hyg <sup>c</sup>
	BW164	ACTAGGGCCTGAGTGGCCATGTCGGCTCGTCCTCAGAAC	linke Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW176	ACTAGGCCCACTAGGCCAGGAGATGATGCGGAGTGG	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	BW177	CAGAGGCCGTAGCGGCCGCCATCTTCGTATTGAG	rechte Flanke	<i>SfiI</i>	
	oJS98	TAGGGGTACCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGC	<i>pcrg1</i> , Hyg		
	BW178	ACTAGGCCTAGTGGGCCAATCCTGTTGCCGGTCTTGC	<i>pcrg1</i> , Hyg	<i>SfiI</i>	
	BW187	ATAGTCTCGGGACCGTCAAC			
	BW188	TCAGATGTGCAGCCTACCTC			
Für die Herstellung von Hefekomplementationskonstrukten					
pYES2- <i>fer6</i>	BW153	GAGAATTCGCGCTTATTTCCATTACCC	<i>fer6</i>	<i>EcoRI</i>	Ura
	BW154	GATGGATCCTCAACTGCCAAGATGAC		<i>BamHI</i>	
pYES2- <i>fer7</i>	BW155	GAGAATTCGCCAACGCGACCATTACCAG	<i>fer7</i>	<i>EcoRI</i>	Ura
	BW156	GATGGATCCATGTCGAACCAAGCTCAAG		<i>BamHI</i>	
pYES2- <i>cim1</i>	BW159	GAGAATTCGCGCGAGACAAGTAATGTAG	<i>cim1</i>	<i>EcoRI</i>	Ura
	BW160	GATGGATCCATGTCGCTCTTTTCGACGC		<i>BamHI</i>	
pYES2- <i>cim2</i>	BW157	TCTCTAGAGGCTGATGATGATACGCCAGTC	<i>cim2</i>	<i>XbaI</i>	Ura
	BW158	GCGGCCGCATGCAAGAACCGCTGACATG		<i>NotI</i>	
pYES2- <i>cim3</i>	BW185	TCAGTGCGGCCGCGCGATCAGTTGAGGGATTG	<i>cim3</i>	<i>NotI</i>	Ura
	BW186	CAGTCGAGCTCATGACGTCCAATGCTTCC		<i>SacI</i>	
pYES2- <i>arn1</i>	BW161	GACTCTCGAGTAAACATCAACTTATTCCCG	<i>arn1</i>	<i>XhoI</i>	Ura
	BW162	GACTCAGCTGATGGAGTCTGTTCACCTCTCG		<i>PvuII</i>	
pYES2- um02744	BW261	GAGAATTCGAACCCTATTTCGACACAGTTG	um02744	<i>EcoRI</i>	Ura
	BW262	AGCTGCGGCCGCTCGCATATCGGTTTCAGGAG		<i>NotI</i>	
pYES2- um02763	BW263	AGCTGCGGCCGCACGGCATAAGCAAAGGAG	um02763	<i>NotI</i>	Ura
	BW264	ATGGATCCATCATCATGGCTGCTCCAAC		<i>BamHI</i>	
p416MET 25-Um <i>yap1</i>	BW272	GATGGATCCGCGTTCCACCATGTCATC	<i>U. maydis</i> <i>yap1</i>	<i>BamHI</i>	Ura
	BW273	GAGAATTCATTAAGGTGTCCGCCTTTTCG		<i>EcoRI</i>	
p416MET 25-Sc <i>hap4</i>	BW274	GCACTAGTATGACCGCAAAGACTTTTCTAC	<i>S. cerevisiae</i> <i>hap4</i>	<i>SpeI</i>	Ura
	BW275	GATGGATCCCTATTTCAAAATACTTGTTACC		<i>BamHI</i>	

<sup>a</sup> Die Resistenzkassette stammte aus pMF1-h (Brachmann *et al.*, 2004).

<sup>b</sup> Die Resistenzkassette stammte aus pBS-hhn (Kämper, 2004).

<sup>c</sup> Die Resistenzkassette und der *pcrg1*-Promotor stammten aus pMF4-1h (Brachmann *et al.*, 2004)



Tabelle 3: Oligonukleotide für die qRT-PCR

Gen	Primer name	Sequenz in 5'-3'Richtung	Fragmentgröße
<i>sid1</i>	BW45	CCTGCTCCTTGTGATGTAG	74 bp
	BW46	CAGCTTCCACGTACAGTTTC	
<i>fer2</i>	BW265	GGCACTTTAACTGCTGCAACC	77 bp
	BW266	TCCAACCCACAAGCGAGTTC	
<i>ppi</i>	BW267	ACATCGTCAAGGCTATCG	83 bp
	BW268	AAAGAACACCGGACTTGG	

Tabelle 4: Oligonukleotide für die Generierung von Northern-Sonden

Gen	Primer name	Sequenz in 5'-3'Richtung	Fragmentgröße
<i>sid1</i>	FL57	CGCGGAACATTGGCCTTG	615 bp
	BW52	GTGAGCCTTCTCCTGTTTCC	
<i>fer2</i>	FL6	GCGCGGAAGATCATGGTG	801 bp
	BW12	TCTCGCCTCTCGATTTC	

#### 4.4 Plasmide und Konstrukte

In dieser Arbeit verwendete Plasmide:

##### **pBS-Cbx** (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält den offenen Leserahmen für die Carboxin-resistente Succinatdehydrogenase unter Kontrolle des nativen *cbx*-Promotors. Die Resistenzkassette (1,9 kb) kann durch *Sfi*I aus dem Plasmid herausgeschnitten werden. Dabei unterscheiden sich die beiden *Sfi*I-Schnittstellen in ihrer Sequenz.

##### **pBS-Hyg** (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette unter Kontrolle des konstitutiven *hsp70*-Promotors aus *U. maydis*. Die Resistenzkassette (2,7 kb) kann durch *Sfi*I aus dem Plasmid herausgeschnitten werden. Dabei unterscheiden sich die beiden *Sfi*I-Schnittstellen.

Da der *hsp70*-Terminator in diesem Plasmid leichte Promotoraktivität zeigen kann, wurde im späteren Verlauf dieser Arbeit das Plasmid pBS-hhn verwendet.

##### **pBS-hhn**

Dieses pBS-Hyg-Derivat enthält einen verkürzten nos-Terminator. Die Resistenzkassette (1,8 kb) kann durch *Sfi*I aus dem Plasmid herausgeschnitten werden. Dabei unterscheiden sich die beiden *Sfi*I-Schnittstellen.

##### **pBS-Phleo** (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält eine Phleomycin-Resistenzkassette unter Kontrolle des konstitutiven *hsp70*-Promotors. Die Resistenzkassette (2,2 kb) kann durch *Sfi*I aus dem Plasmid herausgeschnitten werden. Dabei unterscheiden sich die beiden *Sfi*I-Schnittstellen.

##### **pTC-Nat** (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält eine Nourseothricin-Resistenzkassette unter Kontrolle des konstitutiven Promotors der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *U. maydis*. Die Resistenzkassette (1,4 kb) kann durch *Sfi*I aus dem Plasmid herausgeschnitten werden. Dabei unterscheiden sich die beiden *Sfi*I-Schnittstellen.

##### **pCR2.1-TOPO** (Invitrogen)

Dieser Vektor enthält einen einzelsträngigen T-Überhang, in den durch die assoziierte Topoisomerase PCR-Produkte mit A-Überhang eingefügt werden können.

##### **pYS34** (Curie *et al.*, 2001)

Dieses Plasmid wurde verwendet, um das Gen des *Zea mays* Phytosiderophortransporter *ys1* mittels *Xho*I und *Eco*RI auszuschneiden.

**pYES2 (Invitrogen)**

Dieses Plasmid diente zur Expression der Siderophorimportkandidaten (*fer6*, *fer7*, *cim1*, *cim2*, *cim3*, *arn1*) und Phytosiderophorimportkandidaten (*um02744*, *um02763*, *ys1*) in *S. cerevisiae*. Das Plasmid enthält zu diesem Zweck den Galaktose-induzierbaren *gal1*-Promotor, hinter den die offenen Leserahmen der zu untersuchenden Gene in die multiple Klonierungsstelle (MCS) eingebracht werden können. Hinter der MCS befindet sich ein *cyc*-Terminator. Für die Replikation des Plasmides in *S. cerevisiae* enthält es einen 2  $\mu$  Origin und für die Selektion positiver Transformanten das *ura3*-Gen. Für die Vervielfältigung des Plasmides in *E. coli* enthält es einen pUC Origin, sowie und das Gen für die  $\beta$ -Laktamase.

**p416MET25 (Mumberg *et al.* 1994)**

Dieses Plasmid diente zur Expression von *U. maydis yap1* und *S. cerevisiae hap4* in *S. cerevisiae*. Das Plasmid enthält zu diesem Zweck den Methion-reprimierten *pmet*-Promotor, hinter den die offenen Leserahmen der zu untersuchenden Gene in die multiple Klonierungsstelle (MCS) eingebracht werden können. Hinter der MCS befindet sich ein *cyc*-Terminator. Für die Replikation des Plasmides in *S. cerevisiae* enthält es eine *cen*-Origin und für die Selektion positiver Transformanten das *ura3*-Gen. Für die Vervielfältigung des Plasmides in *E. coli* enthält es eine pUC Origin, sowie das Gen für die  $\beta$ -Laktamase.

In dieser Arbeit hergestellte Konstrukte:

**k.o.-Konstrukt *fer4*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW19 und BW20 für die linke Flanke (1714 bp), bzw. BW21 und BW22b für die rechte Flanke (1238 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Cbx-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pBS-Cbx ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (4850 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert. Ein richtiges Plasmid diente anschließend als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW19 und BW22b.

**k.o.-Konstrukt *fer5*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW23 und BW24 für die linke Flanke (994 bp), bzw. BW25 und BW26 für die rechte Flanke (905 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Phleo-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pBS-Phleo ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (4307 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert. Ein richtiges Plasmid diente anschließend als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW23 und BW26.

**k.o.-Konstrukt *fer6*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW27 und BW28 für die linke Flanke (1029 bp), bzw. BW29 und BW30 für die rechte Flanke (1025 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Phleo-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pBS-Phleo ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (4462 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert.

Die Phleo-Resistenzkassette wurde anschließend durch die Hyg-Resistenzkassette aus pBS-Hyg ausgetauscht. Dieser Austausch war notwendig, da die Wirkung von Phleomycin durch eine hohe Eisenkonzentration innerhalb der Zelle verstärkt wird (Haas *et al.*, 1999). Eine Mutante, die weniger Siderophore in das Medium sekretieren kann, sollte eine höhere Eisenkonzentration aufweisen und daher sensitiver gegenüber Phleomycin sein. Tatsächlich konnten keine Transformanten mit dem ersten k.o.-Konstrukt *fer6* mit der Phleo-Resistenzkassette erzielt werden.

Nach dem Austausch der Phleo- durch die Hyg-Resistenzkassette diente das entstandene Plasmid als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW27 und BW30.

**k.o.-Konstrukt *fer7*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide FL29 und FL30 für die linke Flanke (1004 bp), bzw. BW33 und BW34 für die rechte Flanke (915 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Cbx-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pBS-Cbx ausgeschnitten

wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (3817 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert. Ein richtiges Plasmid diente anschließend als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern FL29 und BW34.

**k.o.-Konstrukt *fer8*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW31 und BW32 für die linke Flanke (864 bp), bzw. BW43 und BW6 für die rechte Flanke (1010 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Nat-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pTC-Nat ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (3311 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert. Ein richtiges Plasmid diente anschließend als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW31 und BW6.

**k.o.-Konstrukt *sid1*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW39 und BW40 für die linke Flanke (982 bp), bzw. BW41 und BW42 für die rechte Flanke (1061 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Nat-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pTC-Nat ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (3480 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert. Ein richtiges Plasmid diente anschließend als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW39 und BW42.

**k.o.-Konstrukt *act1*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW132 und BW133 für die linke Flanke (1055 bp), bzw. BW134 und BW135 für die rechte Flanke (1109 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Phleo-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pBS-Phleo ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (4572 bp) diente als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW132 und BW133.

**k.o.-Konstrukt *act2*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW140 und BW141 für die linke Flanke (1003 bp), bzw. BW142 und BW143 für die rechte Flanke (1102 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Nat-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pTC-Nat ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (3542 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert. Ein richtiges Plasmid diente anschließend als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW140 und BW143.

**k.o.-Konstrukt *act3*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW136 und BW137 für die linke Flanke (1070 bp), bzw. BW138 und BW139 für die rechte Flanke (1023 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Cbx-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pBS-Cbx ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (3991 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert. Ein richtiges Plasmid diente anschließend als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW136 und BW137.

**k.o.-Konstrukt *act4*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW144 und BW145 für die linke Flanke (1115 bp), bzw. BW146 und BW147 für die rechte Flanke (1025 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Hyg-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pBS-hhn ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (4860 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert. Ein richtiges Plasmid diente anschließend als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW144 und BW147.

**k.o.-Konstrukt *cim1*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW165 und BW166 für die linke Flanke (1089 bp), bzw. BW167 und BW168 für die rechte Flanke (1066 bp) verwendet. Die Flanken wurden

mit *SfiI* geschnitten und mit der Hyg-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pBS-hhn ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (4875 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert. Ein richtiges Plasmid diente anschließend als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW165 und BW168.

#### **k.o.-Konstrukt *cim2*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW169 und BW170 für die linke Flanke (1025 bp), bzw. BW171 und BW172 für die rechte Flanke (957 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Hyg-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pBS-hhn ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (4875 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert. Ein richtiges Plasmid diente anschließend als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW169 und BW172.

#### **k.o.-Konstrukt *cim3*:**

Zur Amplifikation der Flanken wurden die Oligonukleotide BW181 und BW182 für die linke Flanke (1050 bp), bzw. BW183 und BW184 für die rechte Flanke (1109 bp) verwendet. Die Flanken wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der Hyg-Resistenzkassette, die durch *SfiI* aus dem Vektor pBS-hhn ausgeschnitten wurde, ligiert. Das Ligationsprodukt (4879 bp) wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO integriert und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt und die Flanken in diesen Plasmiden sequenziert. Ein richtiges Plasmid diente anschließend als Matrize zur Amplifikation des k.o.-Konstruktes mit den Primern BW181 und BW184.

#### ***pcrg1::hcs1***

Dieses Konstrukt diente dem Austausch des endogenen Promotors von *hcs1* gegen den induzierbaren Promotor *pcrg1*. Für die Selektion richtiger Transformanten befindet sich vor dem *pcrg1*-Promotor eine Hyg-Resistenzkassette. Um das Konstrukt aus *pcrg1* und der Resistenzkassette in den Lokus von *hcs1* integrieren zu können, wurden Flanken verwendet, die stromaufwärts (linke Flanke) bzw. stromabwärts (rechte Flanke) des Startcodons von *hcs1* liegen. Für die linke Flanke (1060 bp) wurden die Oligonukleotide BW163 und BW164, für die rechte Flanke (1168 bp) die Oligonukleotide BW176 und BW177 verwendet. Als Matrize diente genomische DNA des *U. maydis* Stammes FB2. Alle vier Oligonukleotide führen *SfiI*-Schnittstellen in die PCR-Produkte ein. Für die Amplifikation des *pcrg1*-Promotor und der Hyg-Resistenzkassette (5115 bp) wurden die Oligonukleotide oJS98 und BW98 und als Matrize das Plasmid pMF4-1h verwendet. Durch den Verdau des PCR-Produktes mit *SfiI* entstanden drei Fragmente von 4407 bp, 696 bp und 12 bp. Das größte Fragment wurde aus einem Agarosegel eluiert. Das Oligonukleotid BW98 führt eine *SfiI*-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Alle Fragmente wurden mit *SfiI* verdaut. Die *SfiI*-verdaute linke Flanke (1038 bp), die rechte Flanke (1147 bp) und das 4407 bp-Fragment von pMF4-1h wurden über die *SfiI*-Schnittstellen ligiert. Das erhaltene Ligationsprodukt (6592 bp) diente als Matrize zur Amplifikation des fertigen Konstruktes (6306 bp). Dazu wurden die Primer BW187 und BW188 verwendet.

#### **pYES2-*fer6***

Für die Amplifikation des offenen Leserahmens von *fer6* wurden die Oligonukleotide BW153 und BW154 verwendet. Als Matrize diente genomische DNA des *U. maydis*- Stammes FB2. Dabei führten die Oligonukleotide eine *EcoRI*- bzw. *BamHI*-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Das Plasmid pYES2 wurde mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut und das 5825 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde das geschnittene PCR-Produkt (4217 bp) in das Plasmidrückgrat ligiert. Der Ligationsansatz wurde gefällt und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt, die zur Transformation kompetenter Hefezellen verwendet wurden.

#### **pYES2-*fer7***

Für die Amplifikation des offenen Leserahmens von *fer7* wurden die Oligonukleotide BW155 und BW156 verwendet. Als Matrize diente genomische DNA des *U. maydis*- Stammes FB2. Dabei führten die Oligonukleotide eine *EcoRI*- bzw. *BamHI*-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Das Plasmid pYES2 wurde mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut und das 5825 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde das geschnittene PCR-Produkt (2095 bp) in das Plasmidrückgrat ligiert. Der Ligationsansatz wurde gefällt und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt, die zur Transformation kompetenter Hefezellen verwendet wurden.

**pYES2-*cim1***

Für die Amplifikation des offenen Leserahmens von *cim1* wurden die Oligonukleotide BW159 und BW160 verwendet. Als Matrize diente genomische DNA des *U. maydis*- Stammes FB2. Dabei führten die Oligonukleotide eine *EcoRI*- bzw. *BamHI*-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Das Plasmid pYES2 wurde mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut und das 5825 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde das geschnittene PCR-Produkt (1799 bp) in das Plasmidrückgrat ligiert. Der Ligationsansatz wurde gefällt und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt, die zur Transformation kompetenter Hefezellen verwendet wurden.

**pYES2-*cim2***

Für die Amplifikation des offenen Leserahmens von *cim2* wurden die Oligonukleotide BW157 und BW158 verwendet. Als Matrize diente genomische DNA des *U. maydis*- Stammes FB2. Dabei führten die Oligonukleotide eine *XbaI*- bzw. *NotI*-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Das Plasmid pYES2 wurde mit *XbaI* und *NotI* verdaut und das 5838 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde das geschnittene PCR-Produkt (3285 bp) in das Plasmidrückgrat ligiert. Der Ligationsansatz wurde gefällt und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt, die zur Transformation kompetenter Hefezellen verwendet wurden.

**pYES2-*cim3***

Für die Amplifikation des offenen Leserahmens von *cim2* wurden die Oligonukleotide BW185 und BW186 verwendet. Als Matrize diente genomische DNA des *U. maydis*- Stammes FB2. Dabei führten die Oligonukleotide eine *NotI*- bzw. *SacI*-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Das Plasmid pYES2 wurde mit *NotI* und *SacI* verdaut und das 5796 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde das geschnittene PCR-Produkt (5938 bp) in das Plasmidrückgrat ligiert. Der Ligationsansatz wurde gefällt und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt, die zur Transformation kompetenter Hefezellen verwendet wurden.

**pYES2-*arn1***

Für die Amplifikation des offenen Leserahmens von *arn1* wurden die Oligonukleotide BW161 und BW162 verwendet. Als Matrize diente genomische DNA des *S. cerevisiae*-Stammes  $\Delta$ *fet3*. Dabei führten die Oligonukleotide eine *XhoI*- bzw. *PvuII*-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Das Plasmid pYES2 wurde mit *XhoI* und *PvuII* verdaut und das 5744 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde das geschnittene PCR-Produkt (1980 bp) in das Plasmidrückgrat ligiert. Der Ligationsansatz wurde gefällt und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt, die zur Transformation kompetenter Hefezellen verwendet wurden.

**pYES2-um02744**

Für die Amplifikation des offenen Leserahmens von um02744 wurden die Oligonukleotide BW261 und BW262 verwendet. Als Matrize diente genomische DNA des *U. maydis*- Stammes FB2. Dabei führten die Oligonukleotide eine *XhoI*- bzw. *PvuII*-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Das Plasmid pYES2 wurde mit *XhoI* und *PvuII* verdaut und das 5744 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde das geschnittene PCR-Produkt (2351 bp) in das Plasmidrückgrat ligiert. Der Ligationsansatz wurde gefällt und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt, die zur Transformation kompetenter Hefezellen verwendet wurden.

**pYES2-um02763**

Für die Amplifikation des offenen Leserahmens von um02763 wurden die Oligonukleotide BW263 und BW264 verwendet. Als Matrize diente genomische DNA des *U. maydis*- Stammes FB2. Dabei führten die Oligonukleotide eine *NotI*- bzw. *BamHI*-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Das Plasmid pYES2 wurde mit *NotI* und *BamHI* verdaut und das 5798 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde das geschnittene PCR-Produkt (2334 bp) in das Plasmidrückgrat ligiert. Der Ligationsansatz wurde gefällt und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt, die zur Transformation kompetenter Hefezellen verwendet wurden.

**pYES2-*ys1***

Das Plasmid pYES2 wurde mit *XhoI* und *EcoRI* verdaut und das 5823 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Der offene Leserahmen von *ys1* aus *Zea mays* wurden aus dem Plasmid pYS34 (Curie et al., 2001) mit *XhoI* und *EcoRI* ausgeschnitten und das 2320 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde dieses Fragment in das Plasmidrückgrat ligiert. Der

Ligationsansatz wurde gefällt und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt, die zur Transformation kompetenter Hefezellen verwendet wurden.

### **p416MET25\_Um *yap1***

Für die Amplifikation des offenen Leserahmens von *yap1* wurden die Oligonukleotide BW272 und BW273 verwendet. Als Matrize diente genomische DNA des *U. maydis*- Stammes FB2. Dabei führten die Oligonukleotide eine *Bam*HI- bzw. *Eco*RI-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Das Plasmid p416MET25 (Mumberg *et al.*, 1994) wurde mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut und das 5490 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde das geschnittene PCR-Produkt (2294 bp) in das Plasmidrückgrat ligiert. Der Ligationsansatz wurde gefällt und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt, die zur Transformation kompetenter Hefezellen verwendet wurden.

### **p416MET25\_Sc *hap4***

Für die Amplifikation des offenen Leserahmens von *hap4* wurden die Oligonukleotide BW272 und BW273 verwendet. Als Matrize diente genomische DNA des *S. cerevisiae*-Stammes  $\Delta$ fet3. Dabei führten die Oligonukleotide eine *Spe*I- bzw. *Bam*HI -Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Das Plasmid p416MET25 (Mumberg *et al.*, 1994) wurde mit *Eco*RI und *Bam*HI verdaut und das 5502 bp große Fragment aus einem Agarosegel eluiert. Anschließend wurde das geschnittene PCR-Produkt (1677 bp) in das Plasmidrückgrat ligiert. Der Ligationsansatz wurde gefällt und in Top10 *E. coli*-Zellen transformiert. Durch Testverdau wurden richtige Plasmide bestimmt, die zur Transformation kompetenter Hefezellen verwendet wurden.

## 4.5 Stämme

### 4.5.1 *U. maydis*-Stämme

Tabelle 5: *U. maydis* Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
FB1	a1b1	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	a2b2	Banuett und Herskowitz, 1989
FB1 $\Delta$ <i>sid2</i>	FB1 $\Delta$ <i>sid2</i>	F. Leßing, Diplomarbeit
FB2 $\Delta$ <i>sid2</i>	FB2 $\Delta$ <i>sid2</i>	F. Leßing, Diplomarbeit
FB1 $\Delta$ <i>fer3</i>	FB1 $\Delta$ <i>fer3</i>	F. Leßing, Diplomarbeit
FB2 $\Delta$ <i>fer3</i>	FB2 $\Delta$ <i>fer3</i>	F. Leßing, Diplomarbeit

Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte *U. maydis*-Stämme

Name	Genotyp	Transformiertes Konstrukt	Resistenz
FB1 $\Delta$ <i>sid2</i> $\Delta$ <i>fer3</i>	FB1 $\Delta$ <i>sid2</i> $\Delta$ um01434	k.o.-Konstrukt <i>fer3</i>	Nat, Hyg
FB2 $\Delta$ <i>sid2</i> $\Delta$ <i>fer3</i>	FB2 $\Delta$ <i>sid2</i> $\Delta$ um01434	k.o.-Konstrukt <i>fer3</i>	Nat, Hyg
FB2 $\Delta$ <i>sid1</i>	FB1 $\Delta$ um10188	k.o.-Konstrukt <i>sid1</i>	Nat
FB2 $\Delta$ <i>fer4</i>	FB2 $\Delta$ um10433	k.o.-Konstrukt <i>fer4</i>	Cbx
FB2 $\Delta$ <i>fer5</i>	FB2 $\Delta$ um10432	k.o.-Konstrukt <i>fer5</i>	Phleo
FB2 $\Delta$ <i>fer8</i>	FB2 $\Delta$ um01338	k.o.-Konstrukt <i>fer8</i>	Nat
FB2 $\Delta$ <i>act1</i>	FB2 $\Delta$ um01533	k.o.-Konstrukt <i>act1</i>	Phleo
FB2 $\Delta$ <i>act2</i>	FB2 $\Delta$ um01576	k.o.-Konstrukt <i>act2</i>	Nat
FB2 $\Delta$ <i>act3</i>	FB2 $\Delta$ um10032	k.o.-Konstrukt <i>act3</i>	Cbx
FB2 $\Delta$ <i>act4</i>	FB2 $\Delta$ um05789	k.o.-Konstrukt <i>act4</i>	Hyg
FB2 $\Delta$ <i>act1</i> $\Delta$ <i>act2</i>	FB2 $\Delta$ <i>act1</i> $\Delta$ um01576	k.o.-Konstrukt <i>act2</i>	Phleo, Nat
FB2 $\Delta$ <i>sid2</i> pcrg1:: <i>hcs1</i>	FB2 $\Delta$ <i>sid2</i> pcrg1:: <i>hcs1</i>	pcrg1:: <i>hcs1</i>	Hyg
FB2 $\Delta$ <i>fer6</i>	FB2 $\Delta$ um01431	k.o.-Konstrukt <i>fer6</i>	Hyg
FB2 $\Delta$ <i>fer7</i>	FB2 $\Delta$ um1139	k.o.-Konstrukt <i>fer7</i>	Cbx
FB2 $\Delta$ <i>cim1</i>	FB2 $\Delta$ um04410	k.o.-Konstrukt <i>cim1</i>	Hyg
FB2 $\Delta$ <i>cim2</i>	FB2 $\Delta$ um6349	k.o.-Konstrukt <i>cim2</i>	Hyg
FB2 $\Delta$ <i>cim3</i>	FB2 $\Delta$ um05114	k.o.-Konstrukt <i>cim3</i>	Hyg

Resistenzen: Cbx = Carboxin, Phleo = Phleomycin, Hyg = Hygromycin, Nat = Nourseothricin;  
 $\Delta$ : Deletion des nachfolgenden Genes; pcrg1::*hcs1*: Promotorfusion des *crg1*-Promotors mit dem offenen Leserahmen des Genes *hcs1*; k.o.-Konstrukt: Deletionskonstrukt aus den zwei homologen Flanken und der Resistenzkassette.

Alle Transformanten wurden mittels Southern Blot-Analyse auf die richtige Insertion des transformierten Konstruktes durch homologe Rekombination untersucht.

4.5.2 *S. cerevisiae*-StämmeTabelle 7: *S. cerevisiae*-Ausgangsstämme

Name	Genotyp	Referenz
<i>Δfet3</i>	<i>MATa ura3-52 lys2-801(amber) ade2-101(ochre) trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 Δfet3::His3</i>	Yun <i>et al.</i> , 2000
<i>Δfet3Δarn1Δarn2Δarn3Δarn3</i>	<i>MATa ura3-52 lys2-801(amber) ade2-101(ochre) trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 Δfet3::His3 Δarn1::hisG Δarn2::hisG Δarn3::hisG Δarn4::hisG</i>	Yun <i>et al.</i> , 2000
<i>Δhap4</i>	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, Δhap4::KanMX</i>	Pinkham und Guarente, 1985, Stammsammlung von Open Biosystems

Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellte *S. cerevisiae*-Stämme

Name	Selektionsmarker	Transformiertes Plasmid
<i>Δfet3</i> pYES2- <i>fer6</i>	Ura3	pYES2- <i>fer6</i>
<i>Δfet3</i> pYES2- <i>fer7</i>	Ura3	pYES2- <i>fer7</i>
<i>Δfet3</i> pYES2- <i>cim1</i>	Ura3	pYES2- <i>cim1</i>
<i>Δfet3</i> pYES2- <i>cim2</i>	Ura3	pYES2- <i>cim2</i>
<i>Δfet3</i> pYES2- <i>cim3</i>	Ura3	pYES2- <i>cim3</i>
<i>Δfet3</i> pYES2- <i>arn1</i>	Ura3	pYES2- <i>arn1</i>
<i>Δfet3Δarn1-4</i> pYES2- <i>fer6</i>	Ura3	pYES2- <i>fer6</i>
<i>Δfet3Δarn1-4</i> pYES2- <i>fer7</i>	Ura3	pYES2- <i>fer7</i>
<i>Δfet3Δarn1-4</i> pYES2- <i>cim1</i>	Ura3	pYES2- <i>cim1</i>
<i>Δfet3Δarn1-4</i> pYES2- <i>cim2</i>	Ura3	pYES2- <i>cim2</i>
<i>Δfet3Δarn1-4</i> pYES2- <i>cim3</i>	Ura3	pYES2- <i>cim3</i>
<i>Δfet3Δarn1-4</i> pYES2- <i>arn1</i>	Ura3	pYES2- <i>arn1</i>
<i>Δfet3</i> pYES2-um02744	Ura3	pYES2-um02744
<i>Δfet3</i> pYES2-um02763	Ura3	pYES2-um02763
<i>Δfet3</i> pYES2- <i>ys1</i>	Ura3	pYES2- <i>ys1</i>
<i>Δfet3Δarn1</i> pYES2-um02744	Ura3	pYES2-um02744
<i>Δfet3Δarn1</i> pYES2-um02763	Ura3	pYES2-um02763
<i>Δfet3Δarn1</i> pYES2- <i>ys1</i>	Ura3	pYES2- <i>ys1</i>
<i>Δhap4</i> p416MET25_Um <i>yap1</i>	Ura3	p416MET25_Um <i>yap1</i>
<i>Δhap4</i> p416MET25_Sc <i>hap4</i>	Ura3	p416MET25_Sc <i>hap4</i>

4.5.3 *E. coli*-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 handelt. Genotyp TOP10: F- *mcrA*,  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ,  $\Phi80lacZ\Delta M15$ ,  $\Delta lacX74$ , *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta(ara-leu)7697$ , *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*.



#### 4.6 Molekularbiologische Methoden

##### Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch „Kochende Lyse“ (Sambrook et al., 1989)

1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in dYT-Amp wurden pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge pico). Das Zellpellet wurde in 370 µl STET-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 30 µl Lysozym-Lösung geschüttelt und anschließend für 1 min bei 99°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge pico) und danach das Zellpellet mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Plasmid-Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 450 µl Isopropanol und 35 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 10 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) wurde das Plasmid-Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und nach vollständigem Entfernen des Überstandes in 100 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen.

##### STET-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8,0  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
8% (w/v) Saccharose  
5% (v/v) Triton X-100  
in ddH<sub>2</sub>O

##### TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,9  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
in ddH<sub>2</sub>O

##### Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym  
10 mM Tris-Cl, pH 8,0  
in ddH<sub>2</sub>O

##### Isolation genomischer DNA aus *U. maydis* (modifiziert nach Hoffman and Winston, 1987)

2 ml einer *U. maydis*-Übernachtskultur in YEPSL wurden mit 200 µl Glasperlen in einem 2 ml Zentrifugenröhrchen pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge fresco). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 500 µl TE-Phenol/Chloroform und 500 µl *Ustilago*-Lysispuffer resuspendiert. Zum Aufschließen der Zellen wurden die Proben für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (13.000 Upm, 15 min, RT, Heraeus Biofuge fresco) wurden ca. 500 µl des Überstandes in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und der Extraktionsschritt mit 500 µl TE-Phenol/Chloroform wiederholt. Erneut wurden ca. 500 µl des Überstandes in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 ml 97% Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 1min, RT, Heraeus Biofuge fresco) und vollständigem Entfernen des Überstandes wurde das DNA-Pellet in 50 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

##### *Ustilago*-Lysispuffer

50 mM Tris-Cl, pH 7,5  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
1% (w/v) SDS  
in ddH<sub>2</sub>O

##### TE-Phenol/Chloroform

Mischung aus gleichen Teilen Phenol  
(mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform.

##### Isolation genomischer DNA aus *S. cerevisiae* (modifiziert nach Hoffman and Winston, 1987)

Für die Isolation genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurde wie bei *U. maydis* verfahren.

##### RNA-Isolation aus *U. maydis*-Flüssigkulturen

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem Trizol Reagent (Invitrogen) oder TriReagent (Sigma-Aldrich). Dazu wurden 50 ml einer *U. maydis*-Übernachtskultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,9 pelletiert (3500 Upm, 5 min, Heraeus Biofuge fresco) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Pellet wurde in 1 ml Trizol bzw. TriReagent resuspendiert, und in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Zellen durch Schütteln auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) für 15 min aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (15 min, 4500 Upm, 4°C, Heraeus Biofuge fresco) wurde ca. 1 ml des Überstandes in eine neues 2ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit 1 ml Phenol-Chloroform versetzt, kurz auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) gemischt und zentrifugiert (15 min, 4500 Upm, 4°C, Heraeus Biofuge fresco). Erneut wurde ca. 1 ml des Überstandes in eine neues 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 ml 97%

Ethanol gewaschen. Nach vollständigem Entfernen des Überstandes wurde das RNA-Pellet in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei 50 °C für 5 bis 10 min gelöst. Eine Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

#### **RNA-Isolation aus infiziertem Pflanzengewebe**

Für die quantitative Analyse der Expression von *sid1* und *fer2* während der bitrophen Phase von *U. maydis* (siehe qRT-PCR) wurde RNA aus infiziertem Pflanzengewebe isoliert. Zu diesem Zweck wurden 7 Tage alte Maiskeimlinge (Early Golden Bantam), die in Erde wuchsen, mit einer Kreuzung der kompatiblen Wildtypstämme FB1 und FB2 inokuliert. An den Tagen 2, 5, 7, 8, 9, 10, 13 und 17 nach der Infektion wurde infiziertes Pflanzengewebe gesammelt. Dazu wurde an den ersten Tagen nach der Infektion jeweils das dritte Blatt von mindestens 5 Pflanzen ca. 2 cm unterhalb der Einstichstelle abgeschnitten und der Bereich bis zur Ligula in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Zu späteren Zeitpunkten, an denen bereits Tumorgewebe sichtbar waren, wurden diese von mindestens drei Pflanzen gesammelt und ebenfalls in Zentrifugenröhrchen überführt. Nicht infizierte Randbereiche des Blattes wurden entfernt. Unmittelbar nach dem Sammeln der Proben wurde diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Isolation der RNA bei -80°C gelagert.

Für die Isolation von RNA wurde das Pflanzenmaterial in einem Mörser unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff zerkleinert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Trizol überführt. Nach gründlichem Mischen und 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2 ml Chloroform zugegeben und das Material gründlich gemischt. Nach Phasentrennung (15 min, 4500 Upm, 4°C, Heraeus Multifuge 4 KR) wurden ca. 5 ml des Überstandes in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5 ml Aqua-Phenol/Chloroform (1:1) vermischt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4500 Upm, 4°C, Heraeus Multifuge 4 KR) wurden ca. 4,5 ml des Überstandes mit 4,5 ml Isopropanol in einem neuen Zentrifugenröhrchen versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und die RNA pelletiert (mind. 15 min, 4500 Upm, 4°C, Heraeus Multifuge 4 KR). Das RNA-Pellet wurde mit 80 % Ethanol gewaschen, der Überstand anschließend durch Abgießen und durch Abnahme mittels Pipette vollständig entfernt, und das Pellet in 500 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Um diesen Schritt zu beschleunigen, wurde die RNA in einem Brutschrank bei 50°C für einige Minuten inkubiert. Nach vollständiger Lösung der RNA, gegebenenfalls durch die Zugabe weiteren Wassers, wurde die Qualität auf einem Agarosegel (1% TBE, 5 bis 10 min, 300V) überprüft und die Konzentration photometrisch bestimmt.

#### **Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch in einem NanoDrop (Implen) bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht OD<sub>260</sub> = 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub>. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern.

#### **4.6.1 In vitro Modifikationen von Nukleinsäuren**

##### **Restriktionsverdau**

Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen spezifische DNA-Sequenzen und schneiden die DNA innerhalb dieser Bereiche. Diese Erkennungssequenzen sind zumeist palindromisch und zwischen 4 und 13 bp lang. Der sequenzspezifische Verdau von Plasmid-DNA erfolgte durch Aufnahme der DNA im entsprechenden Restriktionspuffer, Zugabe von 1 bis 2 U Enzym pro µg eingesetzter DNA und Inkubation von mindestens 1 h, besser über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank oder Brutraum. Bei einigen Enzymen war es notwendig Bovines Serumalbumin (BSA) mit einer Endkonzentration von 100 µg/µl zum Reaktionsansatz zu zugeben. Einige Restriktionsenzyme konnten durch 20 min Erhitzen auf 65°C inaktiviert werden. Ein typischer Restriktionsverdau bestand aus 0,5 µg DNA, 2 µl 10 x BSA, 0,25 µl Restriktionsenzym, 2 µl Puffer in einem Endvolumen von 20 µl.

##### **DNA-Fällung**

Zur Anreicherung von DNA in einer Lösung oder zum Wechseln des Puffers wurde die DNA gefällt. Dazu wurde der DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 4,8 und 2,5 Volumen 97 % Ethanol zugesetzt. Durch Invertieren wurden die Lösungen gemischt und für 5 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (10 bis 30 min, 13000 Upm, 4°C oder Raumtemperatur, Heraeus Biofuge fresco), der Überstand verworfen und das DNA-Pellet

gegebenenfalls mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach vollständigem Entfernen des Überstandes wurde die DNA im gewünschten Puffer (z.B. TE-Puffer) aufgenommen und für 10 min bei 55°C gelöst.

### Auftrennung von DNA im Agarose-Gel

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden neutrale Gele aus Agarose verwendet. Als Laufpuffer und als Lösungsmittel für die Agarose wurde 1 x TAE oder 0,5 x TBE verwendet. Die DNA-Lösung wurde vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Auftragspuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde bei analytischen TBE-Gelen mit bis zu 120 V und bei präparativen TAE-Gelen mit nicht mehr als 100 V durchgeführt. Die Färbung der DNA erfolgte während der Elektrophorese mit Ethidiumbromid, das dem Gel zugesetzt wurde. Manche Anwendungen machten eine Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid-Lösung (Roth) zum Laufpuffer nötig. Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Tisch (2UV-Transilluminator, UVP) durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar und dokumentiert (BioDoc-it System, UVP).

#### Auftragspuffer (6x)

50% (w/v) Saccharose  
0,25% (w/v) Bromphenolblau  
10 mM Tris-HCl, pH 7,9  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
in ddH<sub>2</sub>O

#### TBE-Puffer (0,5 x)

50 mM Tris-Borat, pH 7,9  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
in ddH<sub>2</sub>O

#### TAE-Puffer (1 x)

40 mM Tris-Acetat  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
in ddH<sub>2</sub>O

Als Marker diente mit *Pst*I oder *Bst*EII verdauter λ-DNA oder die 2-log und 1 kb-Leiter (New England Biolabs).

### Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die entsprechende Bande wurde auf einem UV-Tisch (2UV-Transilluminator, UVP) sichtbar gemacht und möglichst eng mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dabei war darauf zu achten, dass eine niedrige Strahlungsintensität verwendet und die Dauer der Bestrahlung der DNA möglichst kurz gehalten wurde. Die Bande wurde anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die DNA entweder mit einem Kit oder durch Zentrifugation durch Aquarienwolle (Aqua-perfect, Lapis) eluiert. Dazu wurde in ein 0,5 ml Zentrifugenröhrchen am tiefsten Punkt ein Loch gestochen und mit einer Pinzette Aquarienwolle in das Eppendorfgefäß gestopft. Zur Elution wurde das ausgeschnittene Gelstück auf die Wolle gelegt und das 0,5 ml Gefäß in ein größeres Zentrifugengefäß eingesetzt. Durch Zentrifugation (8000 Upm, 2 min, Heraeus Biofuge pico) wurde die DNA aus dem Gel eluiert.

### Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Eine Denaturierung der RNA wird in dieser Methode durch die Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht. Die RNA-Probe (normalerweise 15 µg) wurde dazu mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 7,2 µl aufgefüllt. Die RNA-Lösung wurde mit 2,4 µl 10xMOPS, 2,4 µl 8 M Glyoxal und 12 µl DMSO versetzt. Die Denaturierung erfolgte für 1 h bei 50°C. Anschließend wurden 4 µl RNA-Auftragspuffer hinzugegeben. Das Gesamtvolumen von 28 µl wurde auf ein 1 %iges MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5-7 V/cm für 2 h, das Gel wurde dabei alle 30 min im Puffer umgedreht und gleichzeitig die Elektrodenpolung vertauscht, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten.

#### MOPS-Puffer

200 mM MOPS, pH 7,0  
80 mM Na-Acetat  
10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

#### RNA-Auftragspuffer

50 % (w/v) Saccharose  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
0,25 % (w/v) Xylencyanol FF  
in MOPS-Puffer

### Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Herstellung von Deletionskonstrukten, enthielt der Ligationsansatz eine Mischung der verdauten und gereinigten DNA-Fragmente in einem pikomolaren Verhältnis von 3:1:3 (Flanke:Kassette:Flanke) in einem maximalen Gesamtvolumen von 30 µl. Der Ligationsansatz enthielt

1/10 Volumen 10x Ligase-Puffer, 1 µl ATP und 1 µl T4-Ligase (Roche). Dieser Ansatz wurde entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C in einem Wasserbad inkubiert. Für die Herstellung von zirkulären Plasmiden wurden die Fragmente in einem äquimolaren Verhältnis gemischt und in einem Gesamtvolumen von maximal 200 µl inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, in 5 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und in *E. coli*-Zellen transformiert.

#### TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten

Bei einigen Deletionskonstrukten war es nötig diese in den Vektor pCR2.1TOPO (Invitrogen) zu klonieren. Das TOPO-Cloning Kit nutzt dabei die Ligase-Aktivität der Topoisomerase aus, die sich an den Enden des linearen Vektors befindet. Für die klonierung von Deletionskonstrukten, deren Flanken auf Grund der Amplifikation mit der Phusion-Polymerase keinen A-Überhang enthalten, wurde zunächst ein solcher Desoxyadenosin-Überhang an den 3'-Enden eingeführt. Dazu wurden 5 µl des aus einem Agarosegel eluierten Deletionskonstruktes mit 0,2 µl dNTPS, 1 µl Taq-PCR-Puffer (s.u.), 1 µl Taq-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt und 10 min bei 72°C inkubiert.

6 µl dieses Ansatzes wurden für die Klonierung in pCR2.1TOPO mit 1 µl des Vektors und 1 µl der mitgelieferten Salzlösung gemischt und für 5 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen. Der Vektor enthält das *lacZ*-Gen, das eine sogenannte Blau-Weiß-Selektion der Transformanten auf X-Gal-haltigen Platten ermöglicht.

#### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion beruht auf dem natürlichen Vervielfältigungsmechanismus der DNA. Damit können bestimmte DNA-Segmente spezifisch amplifiziert werden. Dazu werden Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die komplementär zu den Randbereichen der amplifizierten Region sind. Als DNA-Polymerase wurden die hitzebeständige *Taq*-Polymerase oder die Phusion-Polymerase (New England Biolabs) verwendet. Letztere besitzt zusätzlich zur Polymerase-Aktivität auch noch eine Endonuklease-Aktivität, die eine Fehlerkorrektur bei der Synthese erlaubt und so die Generierung fehlerfreier PCR-Produkte ermöglicht.

Die PCR fand vielfältige Anwendung in dieser Arbeit. Sie ist u. a. eine sehr sensitive Nachweismethode für spezifische DNA-Sequenzen und eignet sich daher zum Durchmustern von *U. maydis* Transformanten. Sie wurde benutzt, um Fragmente für Klonierungen bereitzustellen. Dafür wurden Oligonukleotide verwendet, die im 5'-Bereich nicht vollständig mit der Vorlagen-DNA übereinstimmten, sondern die Erkennungssequenz einer bestimmten Restriktionsendonuklease enthielten (vgl. Tabelle 2).

Ein typischer PCR-Ansatz (Innis *et al.*, 1990) enthielt etwa 10 ng Vorlagen-DNA (Template), die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 µM, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 µM (d. h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), außerdem den Reaktionspuffer mit MgCl<sub>2</sub> mit einer Endkonzentration von 1,5 mM. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Die *Taq*-Polymerase wurde erst nach dem initialen Denaturierungsschritt zugegeben. Für einen 50 µl Ansatz wurden etwa 2 U Enzym eingesetzt. PCR-Ansätze mit Phusion-DNA-Polymerase wurden in der Regel genauso durchgeführt, allerdings in dem entsprechenden Reaktionspuffer. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (PTC 200, MJ Research).

Für die *Taq*-Polymerase wurde folgendes Protokoll verwendet: Initiale Denaturierung bei 94°C für 3 min, 30 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 54 bis 68°C und 1 min/kb Elongation bei 72°C. Abschließend wurde eine Elongation von 10 min bei 72°C durchgeführt. Je nach verwendeten Oligonukleotiden und Länge des Amplifikats wurde die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst.

Bei Verwendung der Phusion-Polymerase fand die Denaturierung bei 98 °C statt. Außerdem wurde die Annealingzeit auf 30 sec/kb und die Elongationszeit auf 15 sec/kb herabgesetzt.

<b>dNTP mix</b>	<b>10x PCR-Puffer (<i>Taq</i>-DNA-Polymerase)</b>
10 mM dATP	500 mM DMSO
10 mM dCTP	100 mM Tris-HCl, pH 8,3
10 mM dGTP	15 mM MgCl <sub>2</sub>
10 mM dTTP	
in ddH <sub>2</sub> O	

#### Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Für die quantitative Bestimmung der Expression von *sid1* und *fer2* während des Infektionsverlaufes wurden quantitative real time PCR-Experimente durchgeführt. Dazu wurde RNA aus infiziertem Pflanzengewebe isoliert (siehe Abschnitt 4.6) und mittels eines RNeasy Kits (Qiagen) aufgereinigt.

Diese RNA stellte ein Gemisch aus pilzlicher und pflanzlicher RNA dar. Die Qualität der RNA wurde mittels Elektrophorese im Bioanalyzer (2100, Agilent) überprüft. Für die Herstellung von cDNA und die anschließende Analyse der Transkriptmengen wurde das SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) den Angaben des Herstellers folgend verwendet.

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 angegeben. Für das Design der Oligonukleotide wurde das Programm CloneManager (Suite 9, Sci-Ed Software) verwendet. Dabei wurden jeweils 10 mögliche Primerkombinationen gesucht, die im 3'-Bereich der Gene banden, die gleiche vorausgesagte Annealing-Temperatur hatten und PCR-Produkte generierten, die eine Länge von 70 bis 100 Nukleotide aufwiesen. Diese 10 möglichen PCR-Produkte wurde mit der Software mfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>) auf ihre Stabilität durch Bildung von Sekundärstrukturen untersucht. Es wurde jeweils die Primerkombination für die qRT-PCR ausgesucht, die das Produkt mit der geringsten Stabilität generierten.

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde der PCR-Ansatz, der als Farbstoff SYBR green enthielt, laut Herstellerangaben mit dem SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) angesetzt und folgendes Programm im iCycler (BioRad) verwendet:

Zyklus	Wiederholungen	Zeit	Temperatur	Bemerkungen
1	1	30 sec	95°C	initiale Denaturierung
2	45	15 sec	95°C	Denaturierung
		30 sec	62°C	Annealing, Quantifizierung der Transkriptmenge durch Messung des SYBR green
		30 sec	72°C	Elongation, Quantifizierung der Transkriptmenge durch Messung des SYBR green
3	100	7 sec	72°C	Schmelzkurve, die Temperatur nimmt bei jedem der 100 Einzelschritte um 0,2°C ab

Die Quantifizierung der Transkriptmenge fand durch Messung der Fluoreszenzintensität von SYBR green, das sich in doppelsträngige DNA einlagert, während des Zyklus 2 statt.

Die Auswertung erfolgte mittels des Programms Genex (BioRAD). Dabei wurden die Transkriptmengen von *sid1* und *fer2* ins Verhältnis zur Transkriptmenge des Kontrollgens *ppi* gesetzt. Das „House keeping“-Gen *ppi* wird zu allen Zeitpunkten der Infektion gleich stark exprimiert. Dadurch lässt sich es als Kontrollgen verwenden, mit dem sich die Menge pilzlicher cDNA im Verhältnis zur pflanzlichen cDNA in der Probe bestimmen lässt. Die Expressionwerte von *fer2* und *sid1* ließen sich somit auf die Gesamtmenge pilzlicher cDNA normalisieren. Eine Berechnung der faktoriellen Expressionänderung („fold change“) von *sid1* und *fer2* während des Infektionsverlaufes erfolgte mittels Excel. Dabei wurden die jeweiligen Werte am Tag 2 nach der Infektion als Basis gewählt und gleich 1 gesetzt.

Die Quantifizierung wurde jeweils als Duplikat (*fer2*, *ppi*) oder als Triplikat (*sid1*, *ppi*) durchgeführt. Das ganze Experiment wurde mit RNA aus einer unabhängigen Pflanzeninfektion wiederholt und ergab vergleichbare Resultate.

#### 4.62 Nachweis von Nukleinsäuren

##### Transfer und Nachweis von DNA im Southern-Blot (nach Southern, 1975)

Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Vor dem Transfer wurde das Gel für 20 min in 0,25 M HCl zur Depurinierung schüttelnd inkubiert, um den Transfer großer DNA-Fragmente zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH gewaschen. Der Transfer erfolgte, indem die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt wurde. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran (Roche). Der Kapillar-Blot erfolgte für mindestens für 3,5 h. Nach dem Transfer wurden die Taschen des Geles mit Bleistift auf die Membran gezeichnet.

Für die Markierung einer Sonde mit DIG High Prime (Roche) wurden 100 ng des zu markierenden DNA-Fragmentes in einem Volumen von 16 µl für 10 min bei 95°C denaturiert (Eppendorf Thermomixer) und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl DIG High Prime wurde die Lösung über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Stoppen der Markierungsreaktion erfolgte durch Zugabe von 0,5 µl 0,5 M EDTA, pH8,0 und 10minutige Inkubation bei 65°C (Eppendorf Thermomixer). Die Sonde wurde zu 20 ml auf 65°C vorgewärmten Southern-Hybridisierungspuffer gegeben.

Für die Markierung einer Sonde mit PCR DIG Labeling Mix (Roche) wurden 50 ng Matrizen-DNA mit 10 µl 10fach PCR-Puffer, je 1 µl der beiden Primer, 1 µl Taq-DNA-Polymerase und 5 µl PCR DIG Labeling Mix in einem Gesamtvolumen von 100 µl vermischt. Das PCR-Programm wurde entsprechend der erwarteten Fragmentgröße und der Annealing-Temperatur der Primer gewählt. Nach dem Markieren wurde das DNA-Fragment mit einem PCR Clean up Kit (Qiagen) aufgereinigt, um nicht eingebaute markierte Nukleotide zu entfernen. Die Sonde wurde für 10 min bei 95°C denaturiert (Eppendorf Thermomixer) und zu 20 ml vorgewärmten Southern-Hybridisierungspuffer gegeben.

### 0,5 M EDTA

182,1 g Na<sub>2</sub>-EDTA

mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

pH=8,0 mit 5 M NaOH einstellen, autoklavieren

Durch halbstündige Vorhybridisierung der Membran mit Southern-Hybridisierungspuffer bei 65°C (Hybaid Shake'n'Stack, Thermo Electron Corporation) in einer Hybridisierungsröhre wurden unspezifische Bindungsstellen abgedeckt. Anschließend wurde der Puffer entfernt und die in Southern-Hybridisierungspuffer gelöste Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte mindestens über Nacht drehend bei 65°C im Hybridisierungssofen. Danach wurden die Membranen zweimal mit Southern Waschpuffer bei 65°C gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur im Hybridisierungssofen. Nach einem Waschschrift mit DIG-Waschpuffer für 5 min, wurden die Membranen für 30 min in Blockierungslösung inkubiert. Dann wurden die Membranen für 30 min mit Antikörperlösung geschwenkt. Der Antikörper ist dabei kovalent an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Um überschüssigen Antikörper von den Membranen zu entfernen, wurde zweimal für je 15 min mit DIG Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 5 min mit DIG3 äquilibriert, um den für die alkalische Phosphatase optimalen pH-Wert von 9,5 zu erreichen. Deren Substrat CDP Star (Roche) wurde 1:100 in DIG3 verdünnt und für 5 min zu den Membranen gegeben. Danach wurden die Membranen in Plastikfolie eingeschweißt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Dadurch konnte die lichtproduzierende Reaktion detektiert werden. Die Membranen wurden in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (Kodak X-Omat XAR-5) erfolgte je nach Intensität des Lichtsignals für 1 min bis 30 min durch Auflegung des Filmes auf die eingeschweißte Membran. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60, Konica).

### Southern-Hybridisierungspuffer

500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0

7% (w/v) SDS

mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

Southern-Waschpuffer

0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0

### Natriumphosphatpuffer

Lösung 1 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

Lösung 2 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

Lösung 1 in einem Gefäß vorlegen und solange Lösung 2 zugeben, bis pH 7,0 erreicht ist.

### DIG1

0,1 M Maleinsäure

1% (w/v) SDS

0,15 M NaCl

mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen, pH 7,5

### DIG2

10% (v/v) Blockierungslösung in DIG1

### Antikörperlösung

1:20000 Anti-Digoxigenin-AP in DIG2

### DIG3

0,1 M Maleinsäure

0,1 M NaCl

0,05 M MgCl<sub>2</sub>

mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen, pH 9,5

### DIG-Wasch

0,3% (v/v) Tween-20 in DIG1

### CDP-Star-Lösung

100 µl-CDP-Star (Roche) in 10 ml DIG3

### Southern-Waschpuffer

0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0

1 % SDS

### DIG-Waschpuffer

0,3 % (v/v) Tween-20 in DIG1

**Transfer und Nachweis von RNA im Northern Blot (nach Alwine, 1977)**

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-NX, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC für 3,5 h. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Nach Abschluss des Transfers wurde die RNA durch UV-Crosslinking (120 mJoules/cm<sup>2</sup>, UV Stratalinker 1800, Stratagene) an die Membran gebunden. Der Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylengrün (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

**20x SSC**

300 mM Na-Citrat, pH 7,0

3 M NaCl

Für den spezifischen Nachweis von Transkripten wurde radioaktiv markierter DNA-Sonden hergestellt. Für die Generierung dieser Sonden wurde das NEBlot Kit (New England Biolabs) und radioaktiv markiertes dCTP verwendet. Dazu wurden 25 ng bis 1 µg DNA mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 33 µl aufgefüllt und 5 min bei 95°C in einem Eppendorf Thermomixer denaturiert. Anschließend wurde die DNA für 2 min auf Eis inkubiert und mit den folgenden Komponenten gemischt: 5 µl Klenow-Puffer mit Zufallsoligonukleotiden (New England Biolabs), 6 µl dNTP-Mix (0,5 mM dNTPs 1:1:1) ohne dCTP, 5 µl α<sup>32</sup>P-dCTP, 1 µl Klenow-Enzym (New England Biolabs). Nach 60 minütiger Inkubation bei 37 °C wurden überschüssige Nukleotide und Oligonukleotide durch Aufreinigung über Microspin S-300 HR-Säulchen (GE Healthcare) entfernt. Die Sonde wurde nun zu 10 ml vorgewärmten Hybridisierungspuffer gegeben und für 10 min bei 95°C denaturiert.

Vor der Hybridisierung wurde die Membran für 30 min mit 10 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert, bevor die vorbereitete Sonde auf die Membran gegeben wurde. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 60°C in einem Hybridisierungssofen (Hybaid Shake'n'Stack, Thermo Electron Corporation) statt. Vor der Exposition wurden die Membranen zweimal je 15 min bei 60°C mit Waschpuffer gewaschen, in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager Storm840 (Molecular Dynamics) gelegt. Nach 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven Oberseiten der Kassetten im Phosphorimager eingelesen und mit dem Computerprogramm Imagequant (Molecular Dynamics) bearbeitet.

**Hybridisierungspuffer**

50 ml 1 M Na-phosphatp. pH 7,0

50 ml 1 M PIPES

20 ml 5 M NaCl

250 ml 20% SDS

2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen.

**Waschpuffer**

50 ml 20xSSC

250 ml 20% SDS

mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen.

Für die Analyse des Einflusses von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Expression von *sid1* und *fer2*, wurden Kulturen des Stammes FB2 über Nacht bei 28°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 in CM-Glucose-Medium inkubiert, das entweder kein Eisen enthielt oder mit 10 µM FeSO<sub>4</sub> supplementiert wurde. Die Kulturen wurden zu gleichen Teilen aufgeteilt und die eine Hälfte der Kulturen mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 60 min bei 28°C wurden die Kulturen in Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 3500 Upm, Heraeus Multifuge 4 KR). Der Kulturüberstand wurde vollständig entfernt, das Zellpellet sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Isolation der RNA mittels Trizol bzw. TriReagent (siehe Abschnitt 4.6) bei -80°C gelagert.

**4.7 Mikroskopie**

Für DIC- und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein Zeiss Axioplan II Mikroskop mit einem 100fachen Plan-Apochromat Objektiv (Zeiss) verwendet. Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer CCD Kamera (C4742-95, Hamamatsu) angefertigt. Eine Bearbeitung der Bilder erfolgte mit MetaMorph (Universal Imaging, Downing Town, USA), Photoshop CS2 (Adobe) und Canvas 7.0 (Deneba).

**Calcein-AM**

Für die Bestimmung des freien Eisens innerhalb von *U. maydis*-Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM (Sigma-Aldrich) verwendet. Dazu wurden Kulturen von *U. maydis* über Nacht in AMM-

Medium, das mit 1 % Glucose und 2  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  supplementiert wurde, bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 inkubiert. 25 ml der jeweiligen Kulturen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (3500 Upm, 5 min, Heraeus Multifuge 4 KR). Die Zellen wurden in 0,5 ml PBS resuspendiert und in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer erneuten Pelletierung (13000 Upm, 2 min, Heraeus Biofuge pico) wurden die Zellen mit 0,5 ml PBS gewaschen und anschließend in 0,2 ml PBS aufgenommen. Zu den resuspendierten Zellen wurden 5  $\mu\text{M}$  Calcein-AM (1  $\mu\text{l}$  einer Lösung mit einer Konzentration von 1 mM in DMSO) zugegeben und für 1 Stunde schüttelnd bei 25°C in einem Eppendorf Thermocycler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit je 0,5 ml PBS gewaschen und in 0,2 ml PBS resuspendiert. Für die Mikroskopie wurden Objektträger mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich) beschichtet. Die Mikroskopie erfolgte mit einem FITC-Filterset (BP470/20, FT510, BP515-565). Für die Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität des Calcein-AM in mindestens 36 Vakuolen bestimmt. Dazu wurde das Programm MetaMorph (Universal Imaging, Downing Town, USA) verwendet.

Um zu zeigen, dass Calcein-AM in den Vakuolen von *U. maydis* lokalisiert, wurde eine Gegenfärbung mit dem Vakuolenfarbstoff Cell tracker blue (Molecular Probes) durchgeführt. Dazu wurde 50 min nach Beginn der Inkubation mit Calcein-AM Cell tracker blue in einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  (Ausgangslösung mit 10 mg/ml) zu den Zellen gegeben. Die Fluoreszenz des Farbstoffes wurde mittels eines DAPI-Filter analysiert.

#### **PBS**

8,0 g NaCl  
0,2 g KCl  
1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf 1 l auffüllen

#### **Fluorescent Brightener/Calcofluor white**

Um den Zellseparierungsdefekt der Mutante *FB2 $\Delta$ sid2pcrg1::hcs1* bei Repression des *pcrg1*-Promotors zu visualisieren, wurden Übernachtskulturen der Stämme *FB2 $\Delta$ sid2* und *FB2 $\Delta$ sid2pcrg1::hcs1* in CM-Medium, das 1% Arabinose zur Induktion des Promotors und 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  enthält, bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 wachsen gelassen. Die Kulturen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (3500 Upm, 5 min, Heraeus Multifuge 4 KR) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen und so in CM-Medium mit entweder 1% Arabinose oder 1% Glucose als Kohlenstoffquelle aufgenommen, dass die  $\text{OD}_{600}$  der Kulturen bei 0,05 lag. Die vier Kulturen wurden in Inkubationsflaschen überführt und für 10 Stunde bei 28°C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurde jeweils 1 ml der Kulturen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (13000 Upm, 2 min, Heraeus Biofuge pico). Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml 1 M Tris-HCl pH8 resuspendiert und Calcofluor white (Flourescent Brightener 28, Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  (0,5  $\mu\text{l}$  einer 10 mg/ml-Lösung in DMSO) zu den resuspendierten Zellen gegeben. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Für die mikroskopische Analyse wurden die Zellen in Agarose eingebettet und ein DAPI-Filterset verwendet.

#### **1 M Tris-HCl pH8**

563 mM Tris-HCl  
437 mM Tris-Base

#### **Agarosebett**

1 % Agarose in  $\text{H}_2\text{O}$  lösen, einen Tropfen auf einen Objektträger geben, im rechten Winkel einen zweiten Objektträger auflegen und die Agarose erstarren lassen. Nach Abheben eines Objektträgers wurden 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension auf das Agarosebett geben.

### **4.8 Isolation, Quantifizierung und Detektion von Siderophoren**

#### **Isolation von Siderophoren mittels XAD16-Säulen**

Für die Isolation von Siderophoren aus Kulturüberständen, wurden eine *U. maydis*-Kultur über Nacht in CM-Glucose wachsen gelassen. 50 ml der Kultur wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (3500 Upm, 5 min, Heraeus Multifuge 4 KR). 15 ml des Kulturüberstandes wurden in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 50  $\mu\text{l}$  einer 2 %igen



FeCl<sub>3</sub>-Lösung versetzt (Endkonzentration 1 mg/ml). Um die Kulturüberstände auf die XAD16-Säulen (Sigma-Aldrich) geben zu können, wurden die Säulen wie folgt vorbereitet. Eine Pasteur-Pipette wurde bis zu einer Höhe von ca. 1 cm mit Aquarienwolle gefüllt. Das untere Ende der Pipette wurde mit einem Plastikstopfen verschlossen (Abformmasse aus Vinylpolysiloxan, Dimension Garant L, ESPE 3M). Das Säulenmaterial wurde in einem Becherglas mit Methanol überschichtet, 1 min gründlich mit einem Löffel gemischt und 5 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Methanol abgegossen und das Säulenmaterial mit Wasser überschichtet. Das Säulenmaterial wurde bis zu einer Höhe von ca. 5 cm in die vorbereitete Pasteur-Pipette gefüllt, anschließend mit 10 ml Wasser gewaschen und mit 10 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 äquilibriert. Für die Isolation der Siderophore wurden die 15 ml Kulturüberstand durch die Säule laufen gelassen. Im Anschluss wurde die Säule mit 10 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 gewaschen und die Siderophore mit 3 ml Methanol eluiert. Nach Evaporation des Methanols über Nacht in einer Speedvac (Univapo 100H, Uniequip, mit einer Kältefalle Unicryo MC2L, Uniequip) wurden die Siderophore in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5

Lösung 1: 0,8709 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 100 ml mit Wasser auffüllen

Lösung 2: 0,1361 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 20 ml mit Wasser auffüllen

Für den Puffer 84 ml Lösung 1 mit 16 ml Lösung 2 mischen und den pH-Wert gegebenenfalls justieren.

### Isolation und Messung der Siderophorbiosyntheseintermediate aus Kulturüberständen

Für die Isolation der Zwischenstufen der Ferrichrom A-Biosynthese wurden Kulturen von FB2Δ*fer4* und FB2Δ*fer5* über Nacht in AMM-Medium, das als einzige Kohlenstoffquelle 2,75 mM Leucin enthielt, über Nacht schüttelnd bei 28°C wachsen gelassen. 50 ml der Kulturen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (3500 Upm, 5 min, Heraeus Multifuge 4 KR). Der Kulturüberstand wurde in einen Glaskolben überführt und mit NaCl gesättigt. Mit 6 M HCl wurde ein pH-Wert von kleiner als 2 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 30 ml n-Butylacetat (Sigma-Aldrich) gegeben, gründlich gemischt und nach Phasentrennung die obere Phase in einen neuen Glaskolben überführt. Für einen zweiten Extraktionsschritt wurden zur unteren Phase erneut 40 ml n-Butylacetat zugegeben und nach Phasentrennung die obere Phase zu der oberen Phase aus der ersten Extraktion gegeben. Nach Evaporation im Rotationsverdampfer (50 °C, 50 mbar) wurde das Präzipitat in 1 ml Pyridin (Sigma-Aldrich) gelöst. 50 µl dieser Lösung wurden mit 50 µl N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA, Sigma-Aldrich) vermischt und 20 min bei 60°C inkubiert. Für die Messung im Gaschromatographen wurde die Probe für 1 min bei 70°C erhitzt und anschließend bis auf 280°C aufgeheizt. Dabei stieg die Temperatur mit 4,5°C pro Minute an. Es wurde ein konstanter Druck im Gaschromatographen aufgebaut und die Probe mit einer Ratio von 1:5 gemessen.

Bemerkungen: Die Kulturüberstände wurden mit NaCl gesättigt, um die enthaltenen Ionen in die wässrige Phase zu treiben. Durch Zugabe von HCl kommt es zur Abspaltung des Co-A-Faktors, was eine Messung im Gaschromatographen erleichtert. BSTFA ermöglicht die Bildung eines Trimethylsilylestere. Dadurch werden die Zwischenstufen polarer und können besser detektiert werden.

### Isolation von Phytosiderophoren

Für die Isolation von Desoxymugineinsäure (DMA) wurden 100 Maispflanzen für 25 Tage im Gewächshaus in hydroponischer Kultur (siehe Abschnitt 4.2.4) herangezogen. Am Abend vor der Isolation wurden die Pflanzen in einen abgedunkelten Kellerraum gebracht. Am nächsten Morgen wurden die Pflanzen wieder zurück ins Gewächshaus gebracht und 1,5 Stunden später aus der hydroponischen Kultur entfernt. Jeweils 50 Pflanzen wurden in einen Bottich überführt und die Wurzeln mit 1000 ml Wasser übergossen. Dabei wurde mittels einer Aquarienpumpe ein ständiger Luftzustrom gewährleistet. Nach 4 Stunden wurden die Pflanzen aus dem Wasser genommen und eine Tablette Micropur mit 42 mg (Micropur Classic MC 1T, Roth) in das Wasser gegeben. Für das Entfernen grober Partikel, wurde das Wurzelexudat zunächst zweimal durch einen Faltenfilter gegossen und anschließend steriltfiltriert (Steritop Filter, Millipore). Im Rotationsverdampfer wurde das Wurzelexudat bis zu einem Endvolumen von 50 ml über Nacht bei Raumtemperatur eiedampft.

Für die Isolation von DMA aus dieser restlichen Flüssigkeit wurden Dowex 50 WX8-Säulen (Serva) wie folgt vorbereitet. 100 g des Säulenmaterials wurden in Wasser aufgenommen und in eine Glassäule gefüllt, die sich am unteren Ende verschließen ließ. Die Säule wurde so lange mit Wasser gespült, bis der Durchfluss keine Gelbfärbung mehr aufwies. Anschließend wurde das Wurzelexudat auf die Säule gegeben und mit einem Gradienten aus 0,5 M bis 2 M HCl gewaschen. Die Konzentration der HCl stieg dabei um jeweils 0,25 M an. Es wurden jeweils 10 ml der einzelnen HCl-Lösungen verwendet. Alle Durchflüsse wurden verwahrt und in einer Speedvac (Univapo 100H, Uniequip, mit einer

Kältefalle Unicryo MC2L, Uniequip) evaporiert. Das Präzipitat wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Zunächst wurde die Probe nach der 2 M HCl per HPLC auf DMA analysiert.

#### **HPLC zur Detektion von Siderophoren**

Alle HPLC-Analysen wurden in Kooperation mit Uwe Linne (Fachbereich Biochemie, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Dazu wurde ein HPLC-Gerät der 1100 Serie (Agilent, Deutschland) verwendet, das mit einem Massenspektrometer verbunden war (1100MSD-A ESI-Quadrupol, Agilent, Deutschland)

Für die Detektion von Ferrichrom und Ferrichrom A wurden jeweils 30 µl der Proben verwendet und auf eine 125/2 NucleodurC18ec-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland) aufgetragen. Diese Säule weist eine Partikelgröße von 3 µm auf. Als Laufmittel wurde ein Gradient aus zwei Lösungen verwendet.

Die wässrige Lösung A enthielt 0,05 % Ameisensäure und für die Lösung B wurde Acetonitril verwendet. Beide Lösungen wurden im folgenden Gradienten verwendet. Der Anteil der Lösung B stieg zu Beginn der Messung linear von 5% auf 20 % innerhalb von 15 min an. Dem folgte ein weiterer linearer Anstieg um 2 % innerhalb von 2 min und innerhalb der nächsten 5 min ein Anstieg bis auf 50%. Im weiteren Verlauf der Messung steigt der Anteil der Lösung B innerhalb der nächsten 10 min auf 60% und erreichte nach weiteren 5 min sein Maximum bei 95%. Die Säule wurde für 5 min mit 95% Lösung B gespült. Während des gesamten Laufes betrug die Fließgeschwindigkeit 0,3 ml/min. Die Temperatur der Säule betrug 25°C.

Die Detektion der Siderophore mittels UV-Messung wurde bei 435 nm durchgeführt. Für die massenspektrometrische Analyse wurden folgende Parameter verwendet. Die Masse wurde in einem Bereich von 500 amu (atomare Masseneinheit) bis 1500 amu gemessen. Die Analyse wurde im Positivmodus durchgeführt. Die Messung wurde bei einer Verstärkereinstellung von 2,0 durchgeführt. Der Fragmentor wurde auf 70 eingestellt. Dieser Wert gibt dabei die Stärke der Ionsisierung an. Ist die Einstellung des Fragmentors zu gering, so werden die Ionen nicht in das Massenspektrometer eingebracht. Ist der Wert zu hoch, fragmentieren die Substanzen und können nicht mehr detektiert werden. Als Trägergas diente Stickstoff (N<sub>2</sub>), das mit einer Geschwindigkeit von 13 l/min mit einer Temperatur von 350°C durch das Massenspektrometer floss. Der Zerstäuberdruck betrug 45 psig und die Kapillarspannung 4500 V. Ferrichrome und Ferrichrom A wurden im Vergleich zu spektroskopischen Daten der Standardsubstanzen identifiziert: Ferrichrom  $m/z = 741 [M + H]^+$ , 763  $[M + Na]^+$ , Ferrichrom A:  $m/z = 1053 [M + H]^+$ , 1075  $[M + Na]^+$ .

Für die Detektion von DMA in Wurzelexudaten wurden wie bei Xuan *et al.*, 2006 verfahren. Für die HPLC-Analysen wurden folgenden Parametern verwendet: Als Laufmittel wurde ein Gradient aus zwei Lösungen verwendet. Als Lösung A wurde H<sub>2</sub>O, als Lösung B Acetonitril verwendet. Zu Beginn der Messung wurde die Säule zunächst für 5 min mit 5 % der Lösung B gespült. Innerhalb von 25 min stieg der Anteil von Lösung B auf 70 % und in weiteren 5 min auf 99% an. Für 2 min wurde der Gradient bei 99 % gehalten und sank dann innerhalb von 2 min auf 5 % ab, bevor die Säule abschließend für weitere 6 min mit 5 % Lösung B gespült wurde. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 0,2 ml/min. Es wurde eine 125/2 NucleodurC18ec-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland) mit einer Partikelgröße von 3 µm verwendet. Die Säulentemperatur betrug 45°C auf. Die massenspektrometrische Messung im LTQ-FT (Thermo-Finnigan, Bremen) wurde im Negativmodus durchgeführt.

#### **CAS-Assay zur Quantifizierung von Siderophoren in Kulturüberständen**

Für die Quantifizierung des Siderophorgehaltes in Kulturüberständen von *U. maydis* wurde ein modifizierter CAS-Assay verwendet (siehe Abschnitt 2.1.1.6). Der Eisenchelator Chromeazurol S (CAS, Riedel-de Häen) zeigt einen Farbumschlag von blau zu gelb bei Entfernung des gebundenen Eisens (Schwyn und Neilands, 1987; Payne, 1994). Für die Quantifizierung der Siderophore wurde eine Kultur von *U. maydis* über Nacht in CM-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 schüttelnd bei 28°C inkubiert. 1 ml der Kultur wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (13000 Upm, 2 min, Heraeus Biofuge pico) pelletiert. 100 µl des Kulturüberstandes wurden in einer Mikrotiterplatte mit 100 µl einer zweifach konzentrierten CAS-Lösung gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei 650 nm in einem Safire-Photometer (Tecan, Schweiz) gemessen. Je höher der Absorptionswert, desto mehr Eisen lag in einem Komplex mit CAS vor und die Lösung wies eine Blaufärbung auf. Je mehr Siderophore in die Kulturüberstand durch *U. maydis* sekretiert wurden, desto geringer war die Absorption der gelben Lösung. Dadurch ließ die Absorption einen direkten Schluss auf den Eisen- und Siderophorgehalt in den Überständen von Kulturen zu. Die Auswertung der Absorptionswerte erfolgte mittels des Programms Excel. Dazu wurden jeweils die ermittelten Absorptionswerte für Kulturüberstände auf die OD<sub>600</sub> der Kulturen normalisiert und die Werte von *U. maydis*-Mutanten ins

Verhältnis zu den Werten eines Kontrollstammes gesetzt. Alle Experimente wurden gleichzeitig mindestens als biologische Triplikate durchgeführt.

Für die Analyse des Effektes der Repression von Hcs1 auf die Siderophorbiosynthese wurden die *U. maydis*-Stämme FB2 $\Delta$ sid2 und FB2 $\Delta$ sid2pcrg1::*hcs* über Nacht in CM-Medium, das 1 % Arabinose und 10  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> enthielt, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 schüttelnd bei 28°C inkubiert.

Jeweils zweimal 10 ml der Kulturen wurde in eine Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (3500 Upm, 5 min, Heraeus Multifuge 4 KR) pelletiert. Die Zellen wurde nach zweimaligem Waschen mit Wasser in 10 ml CM-Medium überführt, das entweder 1% Arabinose oder 1 % Glucose enthielt. Anschließend wurden die Zellen so in dem entsprechenden Medium verdünnt, dass die OD<sub>600</sub> 0,05 entsprach. Die Kulturen wurden in Inkubationsflaschen überführt und schüttelnd bei 28°C inkubiert. 6, 7, 8, 9, 10 und 24 h nach dem Mediumwechsel wurde jeweils 1 ml der Kulturen entnommen, die OD<sub>600</sub> bestimmt und ein CAS-Assay wie oben beschrieben durchgeführt.

### **CAS-Lösung (10 fach konzentriert)**

60,5 mg CAS

in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen

72,9 mg HDTMA (Sigma-Aldrich)

in 40 ml H<sub>2</sub>O lösen

Die beiden Lösungen mischen und

10 ml FeCl<sub>3</sub> (1 mM in 10 mM HCl) zugeben.



## 5. Literaturverzeichnis

- Alwine J. C., Kemp D. J., Stark G. R.** (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5350-5354.
- An, Z., Zhao, Q., McEvoy, J., Yuan, W., Markley, J. L., Loeng, S. A.** (1997a) The second finger of *Urbs1* is required for iron-mediated repression of *sid1* in *Ustilago maydis*. *PNAS* **94**: 5882-5887.
- An, Z., Mei, B., Yuan, W., Loeng, S. A.** (1997b) The distal GATA sequences of the *sid1* promoter of *Ustilago maydis* mediate iron repression of siderophore production and interact directly with *Urbs1*, a GATA family transcription factor. *EMBO* **16**: 1742-1750.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P. and Hofte, M.** (2002) Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 1147-1156.
- Ausubel, F. M., Brenz, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Strukl, K.** (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc, USA.
- Ardon O., Weizmann, H., Libmann, J., Shanzer, A., Chen, Y., Hadar Y.** (1997) Iron uptake in *Ustilago maydis*: studies with fluorescent ferrichrome analogs. *Micro.* **143**: 3625-3631.
- Banuett, F.** (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 179-208.
- Bécard, G. und Fortin, J. A.** (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* **108**: 211-218.
- Birch, L. E., Ruddat, M.** (2005) Siderophore accumulation and phytopathogenicity in *Microbotryum violaceum*. *Fungal Genet. Biol.* **42**: 579-589.
- Bölker, M., Urban, M., Kahmann, R.** (1992) The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**: 441-450.
- Bölker M, Basse CW, Schirawski J.** (2008) *Ustilago maydis* secondary metabolism—from genomics to biochemistry. *Fungal Genet Biol.* **Suppl 1**: S88-93.
- Boughammoura, A., Franza, T., Dellagi, A., Roux, C., Matzanke-Markstein, B., Expert, D.** (2007) Ferritins, bacterial virulence and plant defence. *Biometals* **20**: 347-353.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., Feldbrügge, M.** (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genom.* **272**: 216-226.
- Brakhage, A. A., Andrianopoulos A., Kato, M., Steidl, S., Davis, M. A., Tsukagoshi, N., Hynes, M. J.** (1999) HAP-like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: implications for biotechnology. *Fungal Genet. Biol.* **27**: 243-252.
- Breuer W., Epsztejn S., Cabantchik, Z. I.** (1995a) Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron (III). *J. Biol. Chem.* **270**: 24209-24215.
- Breuer W., Epsztejn S., Millgram P., Cabantchik I. Z.** (1995b) Transport of iron and other transition metals into cells as revealed by a fluorescent probe. *Am. J. Physiol.* **268**: C1354-C1361.
- Budde, A. D. und Loeng, S. A.** (1989) Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. *Mycopathologia* **108**: 125-133.

- Carrano, C. J., Raymond, K. N.** (1978) Coordination chemistry of microbial iron transport compounds: rhodotorulic acid and iron uptake in *Rhodotorula pilimanae*. J. Bacteriol. **136**: 69-74.
- Challis, G.L., Ravel, J., Townsend, C. A.** (2000a) Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. Chem Biol. **7**: 211-224.
- Challis, G.L., Ravel, J.** (2000b) Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. FEMS Microbiol. Lett. **187**: 111-114.
- Charlang, G., Ng B, Horowitz, N. H., Horowitz, R. M.** (1981) Cellular and extracellular siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. Mol. Cell. Biol. **1**: 94-100.
- Christenson, L. und Robinson, P. J.** (1963) Late infection of filtration blebs. Trans. Pac. Coast Otoophthalmol Soc Annu Meet. **44**: 95-101.
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulerge, C., Dellaporta, S. L., Briat, J. F., Walker, E. L.** (2001) Maize *yellow stripe 1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. Nature **409**: 346-349.
- Deák, M., Horváth, G. V., Davletova, S., Török, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Király, Z, Dudits, D.** (1999) Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. Nat. Biotechnol. **17**: 192-196.
- Dellagi, A., Rigault, N., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., Briat, J.-F., Gaymard, F., Expert, D.** (2005) Siderophore-mediated upregulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. Plant J. **43**: 262-272.
- Ehrlich H. L.** (1990) Geomicrobiology of iron. In Geomicrobiol, 283-346.
- Budde, A. D. und Leong, S. A.** (1989) Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. Mycopathol. **108**: 125-133.
- Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kämper, J., Müller, P., Kahmann, R.** (2006) A ferrooxidation/permeation iron uptake system is required for virulence of *Ustilago maydis*. Plant Cell **18**: 3332-3345.
- Eisendle, M., Oberegger, H., Zadra I., Haas, H.** (2003) The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding l-ornithine N 5-monooxygenase (*sidA*) and a non-ribosomal peptide synthetase (*sidC*). Mol. Micro. **49**: 359-375.
- Eisendle, M., Schrettl, M., Kragl, C., Müller, D., Illmer, P., Haas, H.** (2006) The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot. Cell **5**: 1596-1603.
- Emery, T. und Neilands, J. B.** (1961) Structure of the ferrichrome compounds. J. Americ. Chem. Soc. **83**: 1626-1628.
- Emery, T. F.** (1966) Initial steps in the biosynthesis of ferrichrome. Incorporation of  $\delta$ -N-hydroxyornithine and  $\delta$ -N-Acetyl- $\delta$ -N-hydroxyornithine. Biochemistry **5**: 3694-3701.
- Enard, C., Dolez, A., Expert, D.** (1988) Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. J. Bacteriol. **170**: 2419-2426.
- Finking, R., Marahiel, M.A.** (2004) Biosynthesis of nonribosomal peptides. Annu. Rev. Microbiol. **58**: 453-488.

- Franza, T., Mahe, B. and Expert, D.** (2005) *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol. Micro.* **55**: 261–275.
- García-Muse, T., Steinberg, G., Pérez-Martín, J.** (2003) Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**: 494–500.
- Garibaldi, J.A., Neilands J.B.** (1955) Isolation and properties of ferrichrome A. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 2429–2430.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M., and Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**: 647–657.
- Grünler, J., Ericsson, J., Dallner, G.** (1994) Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1212**: 259–277.
- Haas, H., Zadra, I., Stoffler, G., and Angermayr, K.** (1999) The *Aspergillus nidulans* GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. *J. Biol. Chem.*, **274**: 4613–4619.
- Haas, H., Schoeser, M., Lesuisse, E., Ernst, J. F., Parson, W., Abt, B., Winkelmann, G., Oberegger, H.** (2003) Characterization of the *Aspergillus nidulans* transporters for the siderophores enterobactin and triacetylfulvarinine. *C. Biochem J.* **371**: 505–513.
- Haas, H., Eisendle, M., Turgeon, G.B.** (2008) Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 149–187.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C.** (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem L.*, **219**: 1–14.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In *DNA cloning: a practical approach*, D. M. Glover, ed. (Oxford, England ; Washington, D.C., IRL Press), pp. 109–135.
- Heymann, P., Gerads, M., Schaller, M., Dromer, F., Winkelmann, G., Ernst, J. F.** (2002) The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infect. and Immun.* **70**: 5246–5255.
- Hof, C., Einfeld, K., Welzel, K., Antelo, L., Foster, A. J., Anke, H.** (2007) Ferricrocin synthesis in *Magnaporthe grisea* and its role in pathogenicity in rice. *Mol. Plant. Pathol.* **8**: 163–172.
- Hoffman, C. S., and Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast – efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*, *Gene* **57**: 267–272.
- Holliday, R.,** (1961) The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.* **2**: 204–230.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. The Handbook of Genetics (ed.R.C. King). In, R. C. King, ed. (New York, Plenum Press).
- Holloman, W. K., Schirawski, J., Holliday, R.** (2008) The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* **45 Suppl 1**: S31–39.
- Hortschansky P., Eisendle, M., Al-Abdallah, Q., Schmidt, A. D., Bergmann S., Thön, M., Kniemeyer, O., Abt, B., Seeber, B., Werner E. R., Kato, M., Brakhage A. A., Haas, H.** (2007) Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex – a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* **26**: 3157–3168.

- Horowitz, N. H., Charlang, G., Horn, G., Williams, N. P.** (1976) Isolation and identification of the conidial germination factor of *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. **127**: 135-140.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., und White, T. J., eds.** (1990). PCR Protocols: a guide to methods and applications. (San Diego, USA, Academic Press).
- Jacobs, J. W. und Walker R. B.** (1977) Localization of iron in *Vigna sinensis* L. and *Zea mays* L. J. Agric. Food Chem. **25**: 803-806
- Kämper, J.** (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. Mol. Genet. Genomics **271**: 103-110.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., González-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H. W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., Birren, B. W.** (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. Nature **444**: 97-101.
- Keller-Schierlein W., Prelog, V., Zahner, H.** (1964) Natürliche Eisen-(111)-trihydroxamat Komplexe, Fortschr. Chem. Org. Naturst. **22**: 279-322.
- Kwok, E. Y., Severance, S., Kosman, D. J.** (2006) Evidence for iron channeling in the Fet3p-Ftr1p high-affinity iron uptake complex in the yeast plasma membrane. Biochem. **45**: 6317-6327.
- Lankford, C.** (1973) Bacterial assimilation of iron. Crit. Rev. Micro. **2**: 273-331.
- Lee, N., Kroken, S., Chou, D. Y., Robertse, B., Yoder, O. C., Turgeon, B. G.** (2005) Functional analysis of analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress. Eukaryot. Cell **4**: 545-555.
- Leeman, M., den Ouden, F. M., van Pelt, J. A., Dirkx, F. P. M., Steijl, H., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B.** (1996) Iron availability affects induction of systemic resistance to fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology **86**: 149-155.
- Loeppert, R. H., Wei, L.-C., Ocumpaugh, W. R.** (1994) Soil factors influencing the mobilization of iron in calcareous soils. In Biochem. of Metal Micronut. in the Rhizosph., CRC Press 343-357.
- Mantovani, R.** (1998) A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. Nucleic Acid Res. **26**: 1135-1143.



- Mata, C.G., Lamattina, L., Cassia, R.O.** (2001) Involvement of iron and ferritin in the potato-*Phytophthora infestans* interaction. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**: 557–562.
- Mei, B., Budde, A., Leong, S.** (1993) *sid1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 903-907.
- Molina L., Kahmann R.** (2007) An *Ustilago maydis* gene involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification is required for virulence. *Plant Cell* **19**: 2293-2309.
- Mori, S., Nishizawa, N.** (1987) Methionine as dominant precursor of phytosiderophores in graminaceae plants. *Plant Cell. Physiol.* **28**: 1081-1092.
- Moye-Rowley W. S., Harshman, K. D., Parker, C. S.** (1998) Yeast Yap1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev.* **3**: 283-292.
- Mumberg, D., Müller, R., and Funk, M.** (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* **22**: 5767–5768.
- Neilands J.B.** (1952) A crystalline organo-iron pigment from a rust fungus (*Ustilago sphaerogena*), *J. Am. Chem. Soc.* **74**: 2846-2847.
- Oberegger, H., Schoesser, M., Zadra, I., Abt, B., Haas, H.** (2001) SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Micro.* **41**: 1077-1089.
- Oberegger, H., Schoesser M., Zadra, I., Schrettl, M., Parson, W., Haas H.** (2002a) Regulation of *freA*, *acoA*, *lysF*, and *cycA* expression by iron availability in *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5769-5773.
- Oberegger, H., Zadra, I., Schoeser, M., Abt, B., Parson, W., Haas, H.** (2002b) Identification of members of the *Aspergillus nidulans* SREA regulon: genes involved in siderophore biosynthesis and utilization. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 781-783.
- Ohra, J., Morita, K., Tsujino, Y., Tazaki, H., Fujimori, T., Goering, M., Evans, S., Zorner, P.** (1995) Production of the phytotoxic metabolite, ferricrocin, by the fungus *Colletotrichum gleosporioides*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 113-114.
- Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K., Turgeon, B. G.** (2006) NPS6, encoding a nonribosomal peptidesynthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell* **18**: 2836-2853.
- Payne, S. M.** (1994) Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Meth. Enzymol.* **235**: 1634-1642.
- Pinkham, J. L., Guarente, L.** (1985) Cloning and molecular analysis of the HAP2 locus: a global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 3410-3416.
- Ramanan, N. und Wang, Y.** (2000) A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* **288**: 1062-1064.
- Rodríguez, J. M., Ruíz-Sala, M., Ugarte M., Peñalva M. A.** (2004) Fungal metabolic model for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency, *JBC* **279**: 4578-4587.
- Roberts, A. L., Pierson, A. J., Panaviene, Z., Walker, E. L.** (2004) Yellow stripe 1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. *Plant Physiol.* **135**: 112-120.

- Rowell, J. B., DeVay, J. E.** (1954) Genetics of *Ustilago zeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathol.* **44**: 356-362.
- Sambrook, J., Frisch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Schaible, U. E., Kaufmann, S. H. E.** (2004) Iron and microbial infection. *Nat. Rev. Micro.* **2**: 946-953.
- Schirawski, J., Böhnert, H. U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L., Kahmann, R.** (2005) Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **17**: 3532-3543.
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Joechl, C., Rogers, T., Arst, H. N. Jr., Haynes, K., Haas, H.** (2004a) Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J. Exp. Med.* **200**: 1213-1219.
- Schrettl, M., Winkelmann, G., Haas, H.** (2004b) Ferrichrome in *Schizosaccharomyces pombe* - an iron transport and iron storage compound. *Biometals* **17**: 647-654.
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., Wallner, A., Arst, H. N. Jr., Haynes, K., Haas, H.** (2007) Distinct roles for intra- and extracellular siderophore during *Aspergillus fumigatus* infection. *Plos Pathogens* **3**: 1195-1207.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I., Kahmann, R.** (1990). The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**: 295-306.
- Schwecke, T., Göttling, K., Durek, P., Dueñas, I., Käufer, N. F., Zock-Emmenthal, S., Staub, E., Neuhoof, T., Dieckmann, R., von Döhren, H.** (2006) Nonribosomal peptide synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* and the architectures of ferrichrome-type siderophore synthetases in fungi. *Chembiochem* **7**: 612-622.
- Schwyn B und Neilands J. B.** (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, *Anal Biochem* **160**: 47-56.
- Servouse, M., Karst F.** (1986) Regulation of early enzymes of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.* **240**: 541-547.
- Shin, S. H., Lim, Y., Lee, S. E., Yang, N. W., Rhee, J. H.** (2001) CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids, *J. Micro. Methods* **44**: 89-95.
- Snetselaar, K. M., Mims, C. W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**: 193-203.
- Snetselaar, K. M., Bolker, M., Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet. Biol.* **20**: 299-312.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W., Kahmann, R.** (1994a) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **13**: 1620-1627.

- Spellig, T., Regenfelder, E., Reichmann, M., Schauwecker, F., Bohlmann, R., Urban, M., Bölker, M., Kämper, J., Kahmann, R.** (1994b) Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **65**: 191-197.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., Marahiel, M. A.** (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**: 493-505.
- Steinberg, G., Wedlich-Söldner, R., Brill, M., Schulz, I.** (2000) Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J. of Cell Science* **114**: 609-622.
- Tavassoli, M., Shayeghi, M., Nasim, A., Watts, F. Z.** (1995) Cloning and characterisation of the *Schizosaccharomyces pombe rad32* gene: A gene required for repair of double strand breaks and recombination. *Nucleic Acids Res.* **23**: 383-388.
- Teichmann, B., Linne, U., Hewald, S., Marahiel, M. A., Bölker, M.** (2007) A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *Ustilago maydis*. *Mol Micro.* **66**: 525-533.
- Thomas, F., Serratrice, G., Béguin C., Saint Aman E., Pierre, J. L., Fontecave M., Laulhère J. P.** (1999) Calcein as a fluorescent probe for ferric iron. *J. Biol. Chem.* **274**: 13375-13383.
- Tobiasen, T., Aahman, J., Slot Ravnholt, K., Bjerrum, M. J., Nedergaard Grell, M., Giese, H.** (2007) Nonribosomal peptide synthetase (NPS) genes in *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* and identification of NPS2 as the producer of ferricrocin. *Curr. Genet.* **51**: 43-58.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., and Holloman, W. K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3703-3709.
- Turgeon, B. G., Oide, S., Bushley, K.** (2008) Creating and screening *Cochliobolus heterostrophus* non-ribosomal peptide synthetase mutants. *Mycol. Res.* **112**: 200-206.
- van der Helm, D., Baker, J. R., Eng-Wilmot, D. L., Hossain, M. B., Loghry, R. A.** (1980) Crystal structure of ferrichrome and a comparison of the structure of ferrichrome A. *J. Amerc. Chem. Soc.* **102**: 4224-4231.
- Voisard, C., Wang, J., McEvoy, J. L., Xu, P., Leong, S. A.** (1993) *urbs1*, a gene regulating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*, encodes a protein similar to the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7091-7100.
- von Döhren, H.** (2004) Biochemistry and general genetics of nonribosomal peptide synthetases in fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **88**: 217-264
- Wang, D.; Budde, A., Leong, S.** (1989) Analysis of ferrichrome biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*: Cloning of an ornithine-N<sup>5</sup>-oxygenase gene, *J. Bacteriol.* **171**: 2811-2818.
- Weinberg, E. D.** (2000) Modulation of intramacrophage iron metabolism during microbial cell invasion. *Microbes Infect.* **1**: 85-89.
- Wilson, S., Tavassoli, M., Watts, F. Z.** (1998) *Schizosaccharomyces pombe* Rad32 protein: A phosphoprotein with an essential phosphoesterase motif required for repair of DNA double strand breaks. *Nucleic Acids Res.* **26**: 5261-5269.

- Xuan, Y., Scheuermann, E. B., Meda, A. R., Hayen, H., von Wirén, N., Weber, G.** (2006) Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **1136**: 73-81
- Yuan, W., Gentil, G., Budde, A., Leong, S.** (2001) Characterization of the *Ustilago maydis* *sid2* gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferrichrome biosynthetic gene cluster, *J. Bacteriol.* **183**: 4040-4051.
- Yun, C.-W., Tiedemann, J. S., Moore, R. E., Philpott, C. C.** (2000a) Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 16354-16359.
- Yun, C.-W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P. O., Botstein, D., Kaplan, J., Philpott, C. C.** (2000b) Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 10709-10715.
- Zdobnov, E.M., and Apweiler, R.** (2001) InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* **17**: 847-848.
- Zuther, K., Myser, P., Hettwer, U., Wu, W., Spiteller, P., Kindler, B. L., Karlovsky, P., Basse, C. W., Schirawski, J.** (2008) The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. *Mol. Micro.* **68**: 152-172.

# Lebenslauf

## **Persönliche Daten:**

Name: Britta-Michaela Winterberg  
Geburtsdatum: 27. August 1980  
Geburtsort: Telgte

## **Schulische und universitäre Ausbildung:**

1987 – 1991	Grundschule Gertraudenstrasse in Mönchengladbach
1991 – 1993	<i>Gymnasium</i> Odenkirchen in Mönchengladbach
1993 – Juli 2000	<i>Gymnasium</i> „Thomaeum“ in Kempen, Abitur (Abschlussnote 1,7)
Oktober 2000	Aufnahme des Biologiestudiums an der Philipps-Universität Marburg
Oktober 2004	Diplomprüfungen in Genetik, Mikrobiologie und Zellbiologie
November 2004 - September 2005	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie in der Gruppe von Prof. Dr. Regine Kahmann
September 2005	Erfolgreicher Abschluss des Biologiestudiums (Abschlussnote 1,2)
Oktober 2005	Aufnahme der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie in der Gruppe von Dr. Jan Schirawski



## Danksagung

Frau Kahmann danke ich herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Abteilung anfertigen zu können, und für die Übernahme des Erstgutachtens. Ich danke Herrn Bölker für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie Herrn Batschauer und Herrn Buckel für Ihre Bereitschaft, meiner Prüfungskommission anzugehören.

Mein herzlicher Dank gilt Jan Schirawski, der mir durch die von ihm gewährten Freiräume die Möglichkeit gab, eigene Ideen zu entwickeln und umzusetzen. Er hat mir stets tatkräftig und hilfsbereit zur Seite gestanden und durch seine Diskussionsfreude konnte sich mein Projekt immer weiter entwickeln. Danke!

Bei Frau Nishizawa, Japan, und Christina Cvitanich, Dänemark, möchte ich mich für die Diskussion im Rahmen der Tagung „International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants“ bedanken. Von Enrico Scheuermann habe ich freundlicherweise Protokolle für die Kultivierung von Mais in Vermiculit und hydroponischer Kultur erhalten.

Von Franziska Lessing konnte ich einige *U. maydis*-Stämme und Primer übernehmen. Bei ihr möchte ich mich zudem für Vorschläge und Ideen bedanken. Miroslav Vraněš stand mir bei der Durchführung und Auswertung der qRT-PCR hilfreich zur Seite.

Ganz besonders dankbar bin ich meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen Elmar Meyer, Christoph Hahne, Mascha Valevich, Bernie Heinze, Theresa Wollenberg, Helen Hülsmann, Dominic Cimiotti, Julia Zielecki, Marco Coelho, Gustavo Gamez, Ronny Kellner, Stephan Poppe und Hassan Ghareeb. Katja Zuther ist nicht nur eine Kollegin, sondern auch eine gute Freundin. Sie alle haben die gemeinsamen Jahre zu einer tollen Zeit gemacht. Durch sie ist die Arbeit immer mit Freude verbunden gewesen. Ich danke für die vielen schönen Stunden, auch außerhalb des Labors.

Für die unterhaltsamen Mittagspausen und so manch nettes Gespräch danke ich Petra Happel, Evelyn Vollmeister, Janine Koepke, Thomas Pohlmann, Kathi Zarnack und Julian König.

Für Diskussionen, Ratschläge, Unterstützungen und eine nette Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Kahmann, Feldbrügge, Basse und Kämper bedanken.

Danken möchte ich außerdem Ria Faber, Heike Stock, Claudia Schäfer und Rolf Rösser für all die Kleinigkeiten und Hilfen.

Mein innigster Dank gilt Markus und meiner Familie, die mich während dieser Zeit grenzenlos unterstützt haben und immer für mich da waren.

DANKE!